



**Universidad Autónoma de Madrid**

**Facultad de medicina.**

Departamento de cirugía

ADMINISTRACIÓN DE CÉLULAS MADRE  
MESENQUIMALES OBTENIDAS DE LA MÉDULA  
ÓSEA PARA TRATAR LAS SECUELAS DEL  
ACCIDENTE CEREBROVASCULAR  
HEMORRÁGICO.

Directores:

Dra. Mercedes Zurita Castillo.

Prof. Jesús Vaquero Crespo.

Trabajo presentado por Laura Otero Ortega para optar al grado de doctor en medicina y cirugía.



Los abajo firmantes, la **Dra Mercedes Zurita Castillo**, Investigadora del Instituto de Salud Carlos III, y el **Prof. Jesús Vaquero Crespo**, Catedrático de Cirugía de la Universidad Autónoma de Madrid,

Hacen constar:

Que Laura Otero Ortega ha realizado bajo su dirección el trabajo que lleva por título: ADMINISTRACIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES OBTENIDAS DE LA MÉDULA ÓSEA PARA TRATAR LAS SECUELAS DEL ACCIDENTE CEREBROVASCULAR HEMORRÁGICO, reuniendo, a su juicio, dicho trabajo, todos los requisitos formales y metodológicos para ser presentado como Tesis Doctoral

En Madrid, a 24 de Enero de 2012.

Dra. Mercedes Zurita Castillo

Prof. Jesús Vaquero Crespo.

A mi familia

Amelia, Juan, Javier y Miguel.

## Agradecimientos

Una vez finalizada mi tesis doctoral, me enfrento al capítulo más emotivo de este trabajo, que es el de sintetizar en unas breves líneas mi más sentida y sincera gratitud hacia las personas que me han ayudado. Cuando miro hacia atrás y pienso en el tiempo que me ha llevado este trabajo, en cada segundo que recuerdo estoy siempre acompañada. Por eso agradezco de todo corazón a todas las personas que con su voluntad, empeño y cariño han iluminado todos los rincones de este camino y por ello, es para mí un verdadero placer utilizar este espacio para ser justa y consecuente con ellas, expresándoles mis agradecimientos.

De forma muy especial, quiero dejar constancia de mi agradecimiento a mis directores de tesis:

A la Dra. Mercedes Zurita por enseñarme todo lo que sé, por creer en mí desde el primer día, por escucharme, por haber apoyado mis ideas, por luchar por mí en todo momento, por todo su tiempo de dedicación y asesoramiento y sobre todo porque ha sabido transmitirme su ilusión por la investigación.

Al Dr. Jesús Vaquero por transmitirme serenidad y protección en cada uno de mis problemas, por enseñarme, por guiarme, por haberme hecho disfrutar de su sabiduría e inteligencia. Su capacidad de trabajo y organización me han servido como referente durante todos estos años. Y sobretodo quiero darle las gracias por darme la oportunidad de llegar a donde estoy.

A mis compañeros del labo, porque entre estudios, objetivos y resultados siempre me he sentido protegida y arropada por su calor humano:

A Ali, por su inestimable apoyo incondicional, por aconsejarme siempre lo mejor, por el cariño que me proporciona, por su bondad, por sus masajes, por su paciencia y su ánimo en mis momentos de desesperación. Por participar en cada uno de los momentos de esta investigación. Por cada minuto de su inhaloterapia. Y sobre todo por su amistad.

A Conchi, le doy las gracias una y otra vez por su entrega, disponibilidad y dedicación absoluta siempre que la he necesitado, tanto en lo personal como en lo profesional. Por compartir conmigo risas, lloros, y alegrías. Por todo el cariño que me ha aportado y por confiar y creer en mí en todo momento. Por los ratitos tan especiales en el Ibiza y por su amistad.

Marta, por hacerme reír a carcajadas, por quitarle importancia a lo que no eran problemas, por tu fidelidad y por tus buenos consejos.

A Celia por lo bien que lo hemos pasado en los cursos y congresos, por preocuparte por mí en los malos momentos y por haber compartido conmigo el camino de la tesis doctoral.

A Miguel por ser tan paciente conmigo, por cuidarme, por tu cariño, por darme confianza a la hora de trabajar y porque juntos hemos conseguido superar muchas dificultades.

A Juancho, por traer alegría y jovialidad al labo y por tener siempre una sonrisa para todos.

En el apartado personal a mi “familia de Madrid” Sofy, Samu, Ire, Isra, Alicina, Belelinys, Pablys, Monso, Carlos, Nata y Pope por acompañarme en cada uno de mis pasos desde que empecé esta carrera y porque sin su presencia mi vida en Madrid no habría tenido sentido. Porque cada uno de ellos me ha aportado algo que me ha hecho ser mejor persona. Por comprenderme y por empatizar cada uno de mis sentimientos, por protegerme, por confiar en mí, por no separarse de mi lado desde cualquier parte del mundo y sobre todo por quererme de forma incondicional. A la casa destruida, por ser mi hogar cada tarde, por hacerme reír, por hacerme sentir especial, por hacer desaparecer todos los problemas al cruzar la puerta y por quererme tanto tal y como soy.

Y, por supuesto, el agradecimiento más profundo y sentido va para mi familia:

A mis padres, dignos de admiración, porque todo lo que soy y seré se lo debo a ellos, y porque con su voluntad y empeño han construido un nido maravilloso para vivir. Por ser un ejemplo para nosotros. El ánimo, el apoyo y el cariño que me brindais me dan la fortaleza necesaria para seguir adelante.

A mi madre, un ejemplo de valentía y fortaleza para todos. Gracias por empujarnos a disfrutar de la vida. Por tus detalles. Por escucharme, por animarme y por abrirme los ojos en todo momento. Por estar ahí siempre.

A mi padre. Por vivir orgulloso de nosotros. Por dar la vida por su familia. Por apoyarme sin límites en todas mis decisiones. Por luchar por nosotros hasta el final.

A mi hermano, por todo lo que significa para mí. Por las risas. Por alegrarme los fines de semana y por hacerme sonreír en cada momento de estudio en mi habitación. Por nuestra complicidad. Por quererme. Por lo orgullosa que estoy de él. Por ser una razón para vivir desde el día que se asomó por la ventana. Hay un amigo en mí...urm#1.

A Tiana, Antonio, Tony, Chus, Fernando, Elena, Irene, Alicia, Teo, Eva, Andrei, Ruth y Mony, por ser tan importantes para mí, por hacerme sentir tan especial, por cuidarme, por criarme, por educarme, por su cariño incondicional y sobre todo por quererme.

A mis abuelos Julián, Lucía, Benjamina y Juan por estar siempre a mi lado.

A Ana, Enrique y Jorge, por haberme hecho sentir una más de la familia.

A Juani, Raquel y Alberto por creer en mí y por animarnos a todos.

Por último, mi mas sincera gratitud y todo mi amor a Miguel, mi novio y amigo, por su inestimable apoyo y comprensión, por ser tan paciente, por cuidarme, por ayudarme tanto en este proyecto y en el de mi vida. Por aquella frase que se hizo realidad y porque gracias a ella hemos compartido una vida. Por estar siempre ahí. Por hacerme feliz. Y sobre todo por todo lo que nos queda por vivir.

A todos, gracias.

## **ABREVIATURAS**

## ABREVIATURAS

---

<b>AA</b>	Ácido Araquidónico.
<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico.
<b>AMPA</b>	2-Amino-3-(5-Methyl-3-oxo-1,2- oxazol-4-yl) Propanoic Acid.
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico.
<b>ATP</b>	Ácido Tricarboxílico.
<b>BDNF</b>	Brain Derived Neurotrophic Factor.
<b>BMP</b>	Bone Mophogenic Proteins.
<b>BO</b>	Bulbo Olfatorio.
<b>CC</b>	Centímetros cúbicos.
<b>cm<sup>2</sup></b>	Centímetros cuadrados.
<b>CMA</b>	Células Madre Adultas.
<b>CME</b>	Células Madre Embrionarias.
<b>CMM</b>	Células Madre Mesenquimales.
<b>CMMA</b>	Células Madre Mesenquimales Adultas.
<b>CMN</b>	Células Madre Neurales.
<b>CNTF</b>	Circulating Tumour Necrosis Factor.
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de Carbono.
<b>COX</b>	Cyclooxygenasa.
<b>DAB</b>	Diaminobencidina.
<b>DCX</b>	Doblecortina.
<b>DEPC</b>	Diethyl Pyrocarbonate.
<b>EDG</b>	Endothelial Differentiation Genes.
<b>EDTA</b>	Ethylenediaminetetraacetic acid.
<b>EGF</b>	Epidermal Growth Factor.
<b>FGF</b>	Fibroblast Growth Factor.
<b>GFP</b>	Green Fluorescent Protein.
<b>h</b>	Horas.

<b>H<sub>2</sub>O</b>	Agua.
<b>HCl</b>	Acido clorhídrico.
<b>HIC</b>	Hemorragia intracerebral.
<b>HTA</b>	Hipertensión arterial.
<b>IL</b>	Interleuquina.
<b>ISCT</b>	International Society Cell Therapy.
<b>Kg</b>	Kilogramo.
<b>MAPC</b>	Multi-Potent Adult Progenitor Cells.
<b>mg</b>	Miligramo.
<b>min</b>	Minuto.
<b>ml</b>	Mililitro.
<b>mm</b>	Milímetro.
<b>mM</b>	Milimolar.
<b>mmol</b>	Milimol.
<b>MMP</b>	Matrix Metaloprotease.
<b>NeuN</b>	Neuronal Nuclei.
<b>NGF</b>	Neural Growth Factor.
<b>NINDS</b>	National Institute of Neurological Disorders and Stroke.
<b>NK</b>	Natural Killer.
<b>NMDA</b>	N-Metil D-Aspartato.
<b>NO</b>	Óxido Nítrico.
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxígeno.
<b>°C</b>	Grados centígrados.
<b>P/V</b>	Peso / Volumen.
<b>p53</b>	Proteína 53.
<b>PBS</b>	Phosphate Buffer Saline.
<b>PDGF</b>	Platelet-Derived Growth Factor.
<b>PGFA</b>	Proteína Gliofibrilar Ácida.
<b>pH</b>	Potencial de Hidrógeno.
<b>PIC</b>	Presión Intracraneal.



<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto.
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central.
<b>TGF</b>	Transforming-Derived Growth Factor.
<b>TNF</b>	Tumor Necrosis Factor.
<b>UK</b>	United Kingdom.
<b>USA</b>	Estados Unidos de América.
<b>UV</b>	Ultravioleta.
<b>VEGF</b>	Vascular Endothelial Growth Factor.
<b>VEGFR</b>	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor.
<b>VIC</b>	Volumen Intracraneal
<b>VTB</b>	Video- tracking-box.
<b>ZL</b>	Zona de Lesión.
<b>ZSV</b>	Zona Subventricular.
<b>μl</b>	Microlitro.
<b>α-MEM</b>	alpha -Mod Eagle`s Medium.

## ÍNDICE

## ÍNDICE

---

<b>Introducción .....</b>	<b>1</b>
Epidemiología.....	3
Factores de riesgo.....	3
Clasificación de la hemorragia cerebral .....	5
Síntomas clínicos .....	5
Fisiopatología de la lesión hemorrágica.....	6
Lesión primaria.....	6
Lesión secundaria .....	7
Terapias frente a la hemorragia intracerebral .....	12
Terapia celular como tratamiento alternativo .....	13
Células madre embrionarias .....	14
Células madre neurales .....	17
Células mesenquimales .....	17
Células madre mesenquimales de la médula ósea .....	20
<b>Hipótesis del estudio .....</b>	<b>23</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>25</b>
<b>Material y métodos .....</b>	<b>27</b>
Animales.....	27
Modelo experimental de hemorragia cerebral en ratas Wistar .....	27
Obtención, expansión y resiembra de las CMMA.....	30
Caracterización fenotípica de las CMMA por citometría de flujo .....	33
Protocolo de obtención de plasma rico en plaquetas .....	35
Modelo de trasplante intralesional de CMMA .....	36
Test de valoración de la función sensitiva y motora .....	39
Sistema de video grabación en campo abierto: VTB test.....	40
Test de valoración sensitivo motora: mNSS .....	41
Test de coordinación motora: Rotarod treadmill.....	40
Obtención y preparación del tejido cerebral .....	41

Estudios histológicos.....	43
Hematoxilina Eosina .....	43
Inmunohistoquímica convencional.....	44
Procedimiento de inmunohistoquímica con DAB.....	46
Procedimiento de Inmunofluorescencia.....	47
Estudio de la muerte celular: Apostain .....	48
Análisis cuantitativo de proliferación y muerte celular .....	50
Hibridación in situ: marcaje del gen SRY del cromosoma Y .....	51
Estudio de la diferenciación neural de CMMA trasplantadas .....	53
Tricómico de Masson.....	54
Análisis estadísticos.....	56
<b>Resultados.....</b>	<b>57</b>
Estudio fisiopatológico de la lesión hemorrágica experimental .....	59
Análisis anatómico del ictus hemorrágico.....	59
Caracterización celular de la zona subventricular .....	60
Migración de los neuroblastos neoformados. Desviación de la CMR .....	62
Caracterización fisiopatológica del ictus hemorrágico experimental .....	64
Distribución de la expresión de las proteínas Doblecortina y Nestina.....	64
Cuantificación de células mitóticas tras la lesión.....	66
Caracterización fenotípica de las células mitóticas .....	67
Estudio de la muerte celular inducida por hemorragia cerebral .....	68
Estudio fisiopatológico de la presencia de macrófagos.....	69
Estudio fisiopatológico de la expresión de VEGF.....	70
Caracterización fenotípica del trasplante a distintos tiempos evolutivos en fase aguda.....	71
Caracterización fenotípica de las CMMA por citometría de flujo .....	71
Estudio anatómico del trasplante de CMMA en fase aguda.....	72
Expresión de proteínas durante la evolución del trasplante de CMMA tras	
la hemorragia cerebral experimental .....	72
Actividad proliferativa a lo largo de la evolución del trasplante de células	
mesenquimales como tratamiento de un ictus hemorrágico .....	74

Análisis cuantitativo de la proliferación como consecuencia del trasplante .....	74
Estudio de la muerte celular tras el trasplante de CMMA.....	76
Comparativa entre distintos medios de suspensión celular en fase crónica .....	77
Estudio de la mejora funcional tras el trasplante de células mesenquimales .....	77
Análisis anatómico del tejido cerebral posterior al trasplante de CMMA.....	80
Activación de la neurogénesis endógena tras el trasplante de CMMA en fase crónica...	82
Variación en la actividad proliferativa inducida por el trasplante según el tipo medio de suspensión de las CMMA. ....	84
Variación del volumen de la lesión cerebral en función del medio de suspensión utilizado en la terapia celular.....	85
Transdiferenciación de las CMMA en el tejido lesionado .....	85
Tricrómico de Masson.....	87
<b>Discusión .....</b>	<b>88</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>113</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>.115</b>

## **I. INTRODUCCIÓN**

## **I. Introducción**

---

El ictus cerebral se define como un trastorno neurológico originado por la alteración brusca del aporte sanguíneo en el cerebro. La enfermedad cerebrovascular supone una de las primeras causas de mortalidad y discapacidad en los países desarrollados. En España, la incidencia del accidente cerebrovascular es de 200 casos por cada 100.000 habitantes. Estas cifras suponen que alrededor de 84.000 personas sufren algún tipo de ictus cada año. En esta definición quedan incluidos los episodios hemorrágicos y los procesos isquémicos. El accidente cerebrovascular hemorrágico constituye el 15% de todos los ictus y están originados por la rotura de un vaso sanguíneo, bien sea en el parénquima (hemorragia intracerebral) o en la superficie cerebral (hemorragia subaracnoidea). El resto de los ictus (85%) son de tipo isquémico, y tienen su origen en el estrechamiento gradual o en la oclusión súbita de alguna de las grandes arterias cerebrales. La hemorragia intracraneal es mucho menos frecuente que el ictus isquémico, pero presenta una mayor mortalidad y morbilidad, siendo una de las primeras causas de discapacidad grave (Ariesen et al., 2003; Qureshi et al., 2001).

La hemorragia intracerebral (HIC) se define como la extravasación aguda de sangre dentro del parénquima cerebral secundaria a una rotura vascular espontánea no traumática en la que el epicentro es siempre el tejido nervioso. La hemorragia cerebral masiva se constituye en forma de un hematoma que se labra en la masa encefálica, disecando las fibras de sustancia blanca con dilaceración de tejido y compresión de las formaciones adyacentes. Si el paciente sobrevive, la hemorragia se reabsorbe progresivamente y la cavidad del hematoma disminuye de tamaño. La formación del hematoma es un proceso dinámico, no es un fenómeno monofásico que ceda inmediatamente, ya que continúa aumentando en las primeras 24 horas. La HIC produce un aumento brusco de la presión intracraneal. Su forma, tamaño y localización son muy variables. Se localiza con más frecuencia en los ganglios de la base, en el hemisferio cerebeloso y en el tronco cerebral.

## **1.- Epidemiología.**

La incidencia anual de la HIC varía en función del país, la raza y el sexo (Broderick et al., 1994). La tasa de incidencia ajustada por año y edad oscila entre 11 y 31 casos por cien mil habitantes y aumenta exponencialmente con la edad llegando a ser de 25 por cada 100.000 habitantes en el grupo de población superior a los 80 años (Norrving, 1998). En cuanto a la recidiva, ésta se estima a los cinco años en 15-40%.

## **2.- Factores de riesgo.**

Los factores de riesgo no modificables mejor conocidos para presentar una HIC son la edad y la raza. Así mismo, existen otros factores de riesgo potencialmente modificables, de los cuáles el más importante es la hipertensión arterial (HTA), además de la angiopatía amiloide cerebral, el abuso de alcohol, malformaciones vasculares, coagulopatías, hemorragia intratumoral, la transformación hemorrágica del ictus isquémico, el creciente uso de fármacos antiagregantes, anticoagulantes, trombolíticos y el consumo de fármacos o drogas con actividad simpaticomimética (Munoz et al., 2008).

- Hipertensión arterial. Como se describe con anterioridad, el factor etiológico más importante es la hipertensión arterial (70-90%), la cual predispone a la ruptura de vasos penetrantes de pequeño calibre (80-300 micras), que se derivan de manera directa de grandes arterias (cerebral media, cerebral anterior, basilar), y que por las características especiales de su pared arterial son susceptibles al daño por la hipertensión. Estos factores anatómicos condicionan que la ubicación de las hemorragias intracerebrales asociadas a hipertensión sean más frecuentes en los ganglios basales (35-45%), sustancia blanca subcortical (25%), tálamo (20%), cerebelo (15%), y puente (5%).

- Angiopatía amiloide cerebral. Se debe al depósito de proteína beta-amiloide en la pared de las arterias de pequeño y mediano calibre de la superficie cortical y leptomeníngea. Es la causa más frecuente de HIC de origen no hipertensivo en adultos de más de 55-60 años de edad. La localización más frecuente de la hemorragia cerebral asociada a angiopatía amiloide es, al contrario de lo que ocurre en la HTA, la lobar, con preferencia por los lóbulos occipital y parietal, aunque puede localizarse en cualquiera de los demás.

- Abuso de alcohol. Actúa produciendo alteraciones plaquetarias y de la coagulación, y afectando a la integridad de los vasos sanguíneos (Juvela et al., 1995)



- Malformaciones vasculares y aneurismas. Las malformaciones vasculares son causa de aproximadamente el 5% de las HIC y deben sospecharse en personas jóvenes, ya que en la población menor de 45 años pueden representar hasta un 38% de los casos. Entre las malformaciones vasculares se incluyen las malformaciones arteriovenosas (su ruptura conduce a un sangrado de localización lobar), angiomas cavernosos, angiomas venosos y telangiectasias capilares.

- Tumores cerebrales. Los tumores constituyen una causa menos frecuente de HIC, situándose entre el 6 y el 10% (Wakai et al., 1982). Cursan distintos aspectos clínicos como son la localización atípica, un gran efecto de masa asociado a edema de la sustancia blanca, el realce nodular en la periferia del hematoma tras la administración de contraste, entre otros datos.

- Anticoagulantes. El tratamiento con anticoagulantes orales dobla el riesgo de presentar una HIC, alcanzando una incidencia anual de entre el 0,3 al 0,6%. Las HIC asociadas a anticoagulantes orales tienen peor pronóstico, aumentando la mortalidad de forma dependiente a la intensidad de la anticoagulación (Rosand et al., 2004).

- Antiagregantes plaquetarios. El tratamiento con ácido acetilsalicílico aumenta el riesgo de HIC en aproximadamente un 40%, siendo éste menor con otros antiagregantes plaquetarios (Hart et al., 2005).

- Trombolíticos. El tratamiento trombolítico para el ictus isquémico y el infarto agudo de miocardio se asocia a HIC. El uso de trombolíticos endovenosos en pacientes con infarto cerebral se relacionó con una frecuencia de HIC de 6,4% respecto a 0,6% en el grupo placebo en el estudio aleatorizado del NINDS (Natural institute of neurologycal disorders and stroke).

- Drogas simpatomiméticas. Las drogas que se asocian más frecuentemente a la HIC son las anfetaminas, la cocaína y los descongestionantes nasales.

- Hipoperfusión cerebral: por hipovolemia o por disminución del gasto cardíaco.

- Las vasculitis no infecciosas: enfermedad de Takayasu, arteritis de la temporal, panarteritis nodosa, angeítis granulomatosa, síndrome de Wegener, entre otras.

- Arteritis infecciosas (sífilis o infecciones víricas próximas a la carótida, como en la amigdalitis).

– Postparto. También la ingesta de estrógenos (anticonceptivos) supone según algunos estudios un factor de riesgo para la aparición de HIC.

### **3.- Clasificación.**

Las hemorragias intracerebrales se clasifican como primarias o secundarias según la causa del sangrado:

– Las hemorragias primarias o espontáneas. Son los ictus hemorrágicos más frecuentes (78-88%) y son debidas a la rotura de cualquier vaso de la red vascular normal del encéfalo, cuya pared se ha debilitado por procesos degenerativos secundarios habitualmente a HTA a pesar de que gracias a la terapia anti hipertensiva, se ha logrado disminuir su incidencia.

– Las hemorragias secundarias se asocian a tumores, malformaciones arteriovenosas, alteraciones en la coagulación, abuso de drogas o sangrados en el interior de una isquemia; están producidas por la rotura de vasos congénitamente anormales, neoformados o con inflamación de su pared o por alteraciones en el sistema de coagulación. Son menos frecuentes, pero es necesario identificarlas puesto que requieren un tratamiento específico (Sacco et al., 1994).

### **4.- Síntomas clínicos.**

Los síntomas de la hemorragia cerebral son variables en función de la parte del cerebro que haya sido afectada. En ocasiones puede ir acompañada de distintos síntomas tales como, pérdida de la conciencia (50%), letárgia (25%), estupor (25%), cefalea (50%), náuseas, vómito (50%) y déficits neurológicos que pueden conducir a una invalidez (Broderick et al., 1994; Giroud et al., 1991; Sacco et al., 1994). El impacto socioeconómico del accidente cerebrovascular es considerable en todo el mundo, pero todavía alcanza mayor relieve debido a la importante tasa de invalidez que produce.

Es evidente que la calidad de vida después de un accidente cerebrovascular depende y necesita de servicios dedicados en exclusiva a ello, por este motivo, en los últimos años, se ha puesto un énfasis cada vez mayor en la necesidad de tales servicios para evitar tensiones, ansiedad y otro tipo de desajustes que los cuidadores y las familias de los pacientes que han sufrido una HIC.

La calidad de vida al año de padecer una HIC, pueden resumirse de esta manera:

- Un 60% de los pacientes mantienen autonomía propia: no requieren asistencia en las actividades de la vida diaria.
- Un 20% necesitan ayuda en tareas complejas.
- Un 15% son parcialmente dependientes y presentan una moderada limitación funcional.
- Finalmente un 5% presentan grave limitación funcional, y son totalmente dependientes.

Es importante evitar el desarrollo o inicio de cualquier síndrome depresivo, que ocurre aproximadamente en un 10-30% de los pacientes que sobreviven a la enfermedad. El inicio precoz de una correcta rehabilitación en el contexto de los cuidados básicos y de mejora de la calidad de vida, puede mejorar los resultados en la recuperación funcional de estos pacientes (Vazquez et al., 1996).

La HIC constituye la tercera causa de muerte después de la enfermedad isquémica del corazón y del cáncer. En personas mayores de 60 años se ha establecido como primera causa de mortalidad, aunque, esta tasa ha ido descendiendo, desde la mejora en el diagnóstico y en el control de HTA. Por otra parte, los factores relacionados con la hipertensión, como el consumo excesivo de alcohol, la obesidad, y la inactividad física, deben ser objetivos prioritarios de la prevención para conseguir una disminución de la mortalidad.

## **5.- Fisiopatología de la lesión.**

### **5. 1.- Lesión primaria. Producción del hematoma.**

Inicialmente la HIC se produce como consecuencia de la ruptura de la pared de vasos sanguíneos dando lugar a un hematoma. El sangrado diseca las fibras de la sustancia blanca y desplaza el tejido cerebral, lo que provoca edema y necrosis isquémica local. El hematoma puede respetar parcialmente el componente neuronal, permitiendo a este componente mantenerse intacto dentro y alrededor del hematoma. En esta fase, la lisis de los eritrocitos y posterior liberación de aminoácidos excitotóxicos y de productos derivados de la hemoglobina, influirán en la lesión cerebral secundaria, entre otros procesos. Histológicamente se evidencia un parénquima edematoso por degradación de productos de la hemoglobina y del daño neuronal. Este área se

caracteriza por la presencia de neutrófilos procedentes del sistema circulatorio y macrófagos derivados de la microglía, que se disponen alrededor del hematoma delimitando el tejido cerebral sano y el lesionado. La hemorragia puede extenderse hacia los ventrículos (especialmente cuando afecta al tálamo y al caudado) y/o al espacio subaracnoideo (Rincon and Mayer, 2004).

## 5. 2.- Lesión secundaria. Edema e isquemia.

Como consecuencia de la hemorragia la presencia del hematoma desencadena edema e isquemia cerebral acompañado de un deterioro tisular importante en el parénquima circundante. Este fenómeno desencadena el empeoramiento durante las primeras 24-48 horas después del inicio de la HIC. Este empeoramiento puede aumentar debido al crecimiento de la hemorragia, al edema perilesional, a las alteraciones del flujo sanguíneo cerebral, a los desplazamientos y hernias cerebrales y, excepcionalmente, al desarrollo de una hidrocefalia obstructiva. El crecimiento de la HIC justifica aproximadamente el deterioro neurológico objetivado en más de la mitad de los pacientes y obedece, probablemente, a la ruptura progresiva de arteriolas y capilares. El edema perilesional de la HIC justifica el deterioro en otro 50% de pacientes durante las siguientes 24-48 horas de evolución (Gebel et al., 2000; Qureshi et al., 2001).

### 5.2.1.- Edema

El edema inicial resulta del efecto osmótico de las proteínas liberadas desde el coágulo que consecuencia un complicado proceso en el que intervienen la alteración de la barrera hemato-encefálica, el fallo de la bomba de sodio y la muerte neuronal, entre otros, pero fundamentalmente la presencia de una serie de proteínas y sustancias vasoactivas, como la trombina, que son liberadas desde el interior del coágulo y será responsable de fenómenos como la inflamación (Delgado et al., 2007; Gebel et al., 2000; Qureshi et al., 2001).

El Sistema Nervioso central (SNC) dispone de células inflamatorias innatas, como la microglía y los macrófagos, las cuales poseen una función importante en la recepción y propagación de señales inflamatorias. Recientemente se ha postulado que el sistema inmune y el proceso inflamatorio participan de forma activa en la pérdida neuronal descrita en enfermedades agudas del SNC. La respuesta inflamatoria en el SNC se caracteriza por la activación de la microglía y astrocitos, y por la expresión de mediadores inflamatorios clave, con una limitada invasión de células inflamatoria circulantes. Este hecho puede verse aumentado por la inducción rápida de la expresión de mediadores inflamatorios, como las citocinas, quimiocinas y prostaglandinas, que

sobrerregulan las moléculas de adhesión y aumentan la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, facilitando la invasión de células inflamatorias circulantes. La microglía posee características de macrófagos como la fagocitosis, producción de citocinas inflamatorias y presentación de antígenos (Nimmerjahn et al., 2005). Además de la microglía, otras células como los astrocitos también expresan mediadores inflamatorios. Los astrocitos son capaces de secretar moléculas inflamatorias, como citocinas y quimiocinas, y de expresar proteínas, como la óxido nítrico sintasa inducible (Che et al., 2001; Dong and Benveniste, 2001; Pekny and Nilsson, 2005). Los fagocitos periféricos, los linfocitos T, las células natural killer (NK) y los leucocitos polimorfonucleares secretan citocinas y pueden contribuir a la inflamación en el cerebro tras la hemorragia cerebral. Los leucocitos también liberan mediadores, como los radicales de oxígeno, las proteasas y las citocinas, que contribuyen al daño neuronal (del Zoppo et al., 1991). En el cerebro, por tanto, tras un ictus hemorrágico existen diferentes tipos celulares capaces de secretar citocinas, como las células de la microglía, astrocitos, células endoteliales y monocitos circulantes, linfocitos T, células NK y células polimorfonucleares producen y secretan citocinas que pueden contribuir a la inflamación del SNC.

Diversas células del sistema nervioso central, como la microglía, la astroglia y las células endoteliales, pueden producir además metaloproteasas (MMP) como MMP-9, en respuesta a diversas citoquinas y factores de crecimiento. Los leucocitos y macrófagos tisulares también colaboran en su síntesis. En cuanto a la hemorragia cerebral, el primer modelo experimental que sugirió un papel de las metaloproteasas fue publicado por Rosenberg y colaboradores (Rosenberg and Navratil, 1997) en el que se mostraba que la MMP-2 y la MMP-9 endógenas se encontraban significativamente elevadas a las 24 horas tras el inicio de la HIC y que su elevación coincidía con el momento de edema máximo. Hoy día se sabe que la MMP-2 (gelatinasa A) y la MMP-9 (gelatinasa B) están implicadas en el edema cerebral. Se ha observado su implicación en la ruptura de la barrera hematoencefálica, con filtración de elementos plasmáticos al tejido cerebral, conduciendo al desarrollo del edema vasogénico. Las MMP se han propuesto como posibles agentes o dianas terapéuticas (Castellanos et al., 2004; Clark et al., 1997; Montaner et al., 2001).

La permeabilidad de la barrera hematoencefálica permite el paso de ciertas sustancias al parénquima cerebral que desencadenan una serie de cascadas metabólicas con potencial lesivo para la membrana celular y que son a su vez edematógenas. En las zonas edematosas se encuentran un cúmulo considerable de

sustancias procedentes del plasma tales como glutamato, serotonina, ácidos grasos y componentes del sistema caliceínacíninógeno-cinina. La liberación de estos elementos justifica que determinadas lesiones de pequeño tamaño sean extraordinariamente edematógenas. Así el ácido araquidónico (AA) y sus metabolitos (prostaglandinas y leucotrienos) son los elementos que mayor capacidad lesiva han demostrado. El AA aumenta su concentración tisular después de ciertas lesiones cerebrales, habiéndose demostrado su papel en la génesis del edema cerebral citotóxico (Castellanos et al., 2004; Clark et al., 1997; Montaner et al., 2001).

En fases tardías de la hemorragia, parte del tejido lesionado queda isquémico. En este momento, el tejido cerebral cambia su metabolismo a glicólisis anaerobia y rompe uniones de compuestos de fosfato (fosfocreatina y adenositrifosfato). Los acontecimientos subsecuentes incluyen la pérdida de los gradientes iónicos transmembranas debido del fallo de la bomba de sodio potasio ATPasa; las neuronas y las células gliales se despolarizan por la entrada de sodio, cloro, calcio y agua al citoplasma. El incremento intracelular de calcio y la acidosis son factores esenciales de la necrosis celular inmediata; posteriormente, la inflamación y la activación de fenómenos apoptóticos contribuirán a la magnitud del daño (Delgado et al., 2007; Gebel et al., 2000; Qureshi et al., 2001).

En los últimos años, muchos estudios se han centrado en la muerte celular secundaria a la hemorragia intracerebral. Los procesos de muerte celular pueden producirse por necrosis o apoptosis. La necrosis ocurre en el sistema nervioso, en áreas gravemente afectadas por un colapso bioquímico, y conduce a la liberación de radicales libres y excitotoxinas (glutamato, calcio, citocinas citotóxicas). Estos eventos se siguen de la ruptura de las membranas nucleares y citoplasmáticas y de la degradación del Ácido desoxirribonucleico (ADN) por cortes enzimáticos producidos al azar en la molécula. Dados los mecanismos que participan y la rapidez con que se produce dicho proceso, la muerte celular por necrosis es muy difícil de prevenir y/o tratar. Por el contrario, la apoptosis o muerte celular programada, ocurre en áreas que no están muy gravemente afectadas (Charriaut-Marlangue et al., 1996; Mayer et al., 2008; Mayer et al., 2009; Mendelow et al., 2005).

La necrosis ocurre en el sistema nervioso, en áreas severamente afectadas por un colapso bioquímico. Como se describe previamente, durante el edema y la hemorragia se generan radicales libres, entre los que se incluye el monóxido de nitrógeno (NO). Se producen especies reactivas de oxígeno por el metabolismo del ácido araquidónico y la NO sintasa neuronal las cuales encadenan mecanismos de lesión intermedios y tardíos

involucrados en la infiltración de neutrófilos en el área hemorrágica y en la síntesis y activación de la NO sintasa inducible y la cicloxigenasa-2. Esta secuencia de eventos conduce a la muerte celular conocida como necrosis definida como la pérdida de la morfología celular debida lisis celular y desencadenamiento procesos inflamatorios (Delgado et al., 2007; Gebel et al., 2000; Qureshi et al., 2001).

El término necrosis reúne los procesos violentos y catastróficos, donde la degeneración celular es pasiva sin un requerimiento de energía en forma de ácido tricarboxílico (ATP). En ella tiene lugar la pérdida aguda de la regulación y de la función celular que conlleva un proceso osmótico desmesurado y finaliza con la lisis de la membrana celular, liberando el contenido intracelular. Este fenómeno conduce a las células vecinas también hacia la muerte, atrayendo, al mismo tiempo, a las células inflamatorias, lo que hace que en las áreas donde se observan células necróticas sea frecuente encontrar nuevas células que desarrollan este tipo de muerte celular, además de originar una reacción de inflamación y una cicatriz fibrosa que deforma el tejido cerebral.

Sin embargo, existe un proceso de muerte apoptótica o muerte celular programada en la cual se activan mecanismos intracelulares dependientes de energía que llevan a una degradación regulada de la célula la cual es eliminada por células fagocíticas más tarde, sin desencadenar reacción inflamatoria. Este tipo de muerte celular es conocido como apoptosis o muerte celular programada. En este proceso las células se autodestruyen sin desencadenar reacciones de inflamación ni dejar cicatrices en los tejidos. La apoptosis es por tanto considerada como una muerte natural fisiológica, resultando en un mecanismo de eliminación de células no deseadas, dañadas o desconocidas.

Entre los segundos mensajeros que participan en los procesos de muerte celular más estudiados se encuentran el calcio y las especies reactivas del oxígeno, aunque recientemente están adquiriendo gran importancia otros como la ceramida y algunas proteínas tales como factores de transcripción (p53) y oncogenes. La activación de estos segundos mensajeros suele conducir a la disfunción de las organelas citoplasmáticas, como la mitocondria y el retículo endoplásmico, o la regulación de la actividad de complejos enzimáticos como cinasas y fosfatasas que a su vez regulan la función de otras proteínas.

### 5.2.2.- Isquemia

El conjunto de sangre extravasada que forma el hematoma induce la separación progresiva de los capilares de los elementos celulares que van a nutrir. Esta separación dificulta el correcto aporte de oxígeno y sustratos necesarios para mantener el metabolismo cerebral. En un cerebro sano, el oxígeno pasa del capilar a la célula por un proceso de difusión, y en todos los procesos difusivos el tiempo requerido por una sustancia para recorrer un determinado espacio es proporcional al cuadrado de la distancia. Esto implica que si se duplica la distancia entre capilar y célula, el oxígeno tardará para recorrer este camino no el doble de tiempo sino cuatro veces más. Por este mecanismo el hematoma puede generar a su vez isquemia.

Aproximadamente 800 ml. de sangre circulan en el cerebro en cada minuto para mantener su mecanismo oxidativo normal. Este flujo continuo se requiere debido a que el cerebro no almacena oxígeno ni glucosa, y de manera casi exclusiva obtiene su energía del metabolismo aeróbico de la glucosa sanguínea. Aproximadamente el consumo de glucosa del cerebro se convierte en Dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) por la vía del ATP, mientras que el 15% se transforma en ácido láctico por glicólisis anaeróbica. El conocimiento de este proceso es importante para comprender que en los casos en los que existe una disminución de la concentración del  $\text{O}_2$ , se producirá por esta vía la mayor cantidad de ácido láctico, el que aumentará la osmolaridad, determinando la formación de edema cerebral y consecuentemente incremento del volumen intracraneal (VIC) y con ello aumento de la presión intracraneal (PIC) con disminución del flujo sanguíneo cerebral; lo que disminuirá el aporte de  $\text{O}_2$ , iniciando así un círculo que constituye uno de los pilares en la producción de la isquemia posterior a la HIC.

La alteración de la disponibilidad de glucosa y oxígeno de la célula provocan la incapacidad de la célula a desarrollar el mantenimiento de su metabolismo oxidativo normal, desencadenando la imposibilidad de síntesis aeróbica de ATP. Como consecuencia, el lactato e iones hidrógeno se acumulan en el tejido neuronal, con un subsecuente cambio en el estado ácido-base tisular. Posteriormente, se alteran el gradiente y el flujo iónico a través de la membrana celular, con apertura de algunos canales selectivos que ocasionan un fenómeno de despolarización iónica, con liberación celular de potasio, sodio, cloro, entrada de calcio y síntesis de aminoácidos excitadores (glutamato y aspartato), que aumentan la toxicidad para el tejido nervioso.

El nucleósido adenosina sería el responsable de la vasodilatación hipóxica. La adenosina es reducida por reacciones de fosforilación a nucleótidos, pudiendo



acumularse en condiciones de isquemia. Está demostrado que la adenosina es un potente vasodilatador cerebral provocando un aumento del flujo sanguíneo cerebral cuando la presión parcial del cerebro es baja. La acción de la adenosina está mediada por ajuste en la liberación de radicales libres de calcio, lo que altera la reactividad del músculo liso. Siendo el CO<sub>2</sub> un producto intermedio del metabolismo cerebral es rápidamente difusible y por tanto tienen un rol importante en la homeostasis cerebrovascular. La alteración en la homeostasis del calcio juega un papel fundamental en el proceso de muerte neuronal. Los aminoácidos excitadores (glutamato), activan algunos receptores postsinápticos (receptores para N-Metil-D-Aspartato o NMDA), contribuyendo al aumento del calcio intracelular, que a su vez participa en la activación de nucleasas, y fosfolipasas que lesionan aún más la membrana neuronal. La liberación de estos lípidos de la membrana contribuye con la formación del ácido araquidónico, y a la generación de radicales libres. Durante la isquemia se generan radicales libres, entre los que se incluye el monóxido de nitrógeno. Se producen especies reactivas de oxígeno involucradas en la infiltración de neutrófilos en el área isquémica. Esta secuencia de eventos conduce a la necrosis (Siesjo, 1992).

## **6.- Terapias actuales frente a la hemorragia cerebral.**

El tratamiento de la HIC requiere una rápida intervención en la mayoría de los casos. Esta situación obliga a una participación activa de todos los profesionales del sistema sanitario en la identificación, valoración inicial, remisión adecuada de pacientes y manejo diagnóstico y terapéutico normalizado basado en las evidencias científicas disponibles:

- La neuroprotección de pacientes con accidente cerebrovascular agudo comienza con la valoración de la vía aérea, respiración, circulación, temperatura corporal y glucosa plasmática. Un componente crucial de la neuroprotección es la prevención del daño cerebral secundario. Esta prevención consiste en evitar las complicaciones: aspiración de secreciones, vigilancia intensiva de la oxigenación, hidratación, tensión arterial, temperatura corporal, glucemia, control de arritmias. Se han estudiado distintos agentes neuroprotectores para salvar tejido neuronal del área de penumbra hemorrágica, hasta la fecha con pocos resultados (Qureshi et al., 2001; Sulter et al., 2003).

- Tratamientos específicos. El tratamiento con factor VII activado recombinante dentro de las cuatro primeras horas tras el inicio de una hemorragia intracerebral, limita el tamaño del hematoma, reduce la mortalidad, y mejora el resultado funcional a los 90

días, a costa de un pequeño incremento en la frecuencia de eventos adversos tromboembólicos (Mayer et al., 2005).

- Rehabilitación del paciente. El objetivo de la rehabilitación en un paciente con enfermedad cerebrovascular establecida es que recobre toda la independencia física, social y emocional posible. Para esto es necesaria la participación de diferentes profesionales sin olvidar la importancia de la familia del paciente, siempre fundamental. Se distinguen dos tipos de rehabilitación en este tipo de pacientes:

- Rehabilitación pasiva. Se realiza siempre en los primeros 15 días tras el episodio y se sabe mantener en el domicilio del paciente en los casos en que éste no recupere la función afectada. Se trata de la movilización por parte de personal cualificado de las articulaciones afectadas, para lograr primero una posterior bipedestación y comenzar lo antes posible con los ejercicios de marcha.

- Rehabilitación activa. Se realizará precozmente en los primeros días del episodio involucrando al paciente para que realice las actividades propias de la vida diaria lo antes posible (Cifu and Stewart, 1999; Helgason and Wolf, 1997).

El tratamiento del hematoma cerebral es, hoy por hoy, uno de los retos más importantes para todo profesional involucrado en el diagnóstico y tratamiento de estos pacientes. Lo es así no sólo por el mal pronóstico que conlleva, sino también por la elevada incidencia de esta entidad, dado el envejecimiento progresivo de la población y la creciente utilización de tratamientos antitrombóticos y anticoagulantes. Finalmente, distintos tratamientos, tanto médicos como quirúrgicos, han demostrado reducir el tamaño del hematoma. Desgraciadamente, esta reducción en volumen no se ha traducido en una mejoría clínica y un mejor pronóstico funcional. Desgraciadamente en la actualidad, no existe ninguna terapia eficaz para paliar los síntomas secundarios a una hemorragia intracerebral.

## **7- Terapia celular como tratamiento alternativo.**

Si bien desde el punto de vista médico, la utilización de órganos para trasplantes ha supuesto una alternativa real para muchos pacientes, en la actualidad se ve limitada por el escaso número de donantes. Esta creciente necesidad de órganos, ha llevado a los investigadores a buscar nuevas alternativas para la reparación/reconstrucción de órganos y tejidos tratando al mismo tiempo de solventar el problema inmune asociado a todo trasplante. En este contexto hoy en día se acuña el término de Terapia celular, que se define como un tratamiento médico especializado en regenerar las células dañadas

tras una lesión o enfermedad, la cual implica la actuación conjunta, multidisciplinar, de diversos campos de la investigación biomédica.

Para lograr sus objetivos la terapia celular utiliza la célula como medicamento. Fuentes celulares autólogas o heterólogas en aplicación sistémica o directa del lugar que se ha de reparar para que en el ambiente adecuado estas células regeneren el tejido. En general, se define una célula madre, como toda célula capaz de autorrenovarse o automantenerse y que además experimenta divisiones asimétricas para generar células diferenciadas (Rao and Mattson, 2001). Se caracteriza además por tener bajo nivel de proliferación. De cada división asimétrica, surge una célula madre igual que la original y otra célula que puede diferenciarse hacia varias estirpes (multilinaje), capaz de originar células madre unipotenciales, que en algunas circunstancias, pueden revertir su dirección y adquirir fenotipo de célula madre (Alison et al., 2002). El número de células madre y el proceso de diferenciación, están regulados según las demandas de cada momento, manteniéndose una cantidad adecuada de células precursoras indiferenciadas y de progenie diferenciada. Además, las células precursoras indiferenciadas que resulten de los procesos de división, pueden permanecer quiescentes hasta estadios tardíos del desarrollo o estar disponibles para situaciones de estrés (Rao and Mattson, 2001). En otras situaciones las células madre pueden transdiferenciarse, término referido a las células que no siguen su proceso restringido de diferenciación normal, pero que pueden transitar hacia otra clase de célula madre. La capacidad de diferenciarse hacia fenotipos no restringidos a su tejido de origen o a la línea germinativa de la cual derivan se denomina plasticidad (Bianchi et al., 2001). Esta característica de las células madre en ocasiones puede ser beneficiosa. Kondo y Raff en el año 2000 mostraron cómo células precursoras de oligodendrocitos podían transdiferenciarse hacia células madre pluripotenciales con capacidad para formar neuronas lo que puede ser de utilidad en procesos de degeneración neuronal. El uso clínico de células madre ha cobrado relevante importancia en los últimos años para el tratamiento de diversas enfermedades y lesiones del Sistema Nervioso.

#### 7.1.- Células madre embrionarias.

Es bien conocida la capacidad de las células madre procedentes de estadios tempranos del embrión de diferenciarse en todo tipo de células somáticas. Tras la fusión del gameto femenino y masculino se inicia el proceso de fecundación. El encuentro del material genético paterno y materno, se continúa con una serie regulada de divisiones mitóticas denominadas segmentación. Las células se denominan blastómeros y se caracterizan por ser células totipotenciales, es decir, poseen todas las capacidades para

dar lugar a todos los tipos celulares en el embrión y a los tejidos extra-embrionarios necesarios para su implante en la pared uterina. Después de la 3ª división, las divisiones se vuelven asincrónicas y las células se transforman en pluripotenciales, forman una masa compacta de células, llamada mórula. Conforme la mórula avanza a lo largo de la trompa, las células continúan dividiéndose formándose una esfera hueca llamada blastocisto, en cuya pared podemos distinguir “trofoblasto” y “embrioblasto”. Las células de la masa interna del blastocisto son células madre pluripotentes (Stocum, 2001) ya que pueden diferenciarse hacia todos los tipos de células y tejidos que constituyen un organismo adulto. En el momento de la implantación en el útero, el blastocisto bilaminar sufre una profunda invaginación y se originan una serie de movimientos celulares que dan comienzo a la gastrulación. El resultado de esta etapa, es la formación de tres capas germinales en el embrión en desarrollo: ectodermo, mesodermo, y endodermo. Células progenitoras o madre forman cada una de las tres capas germinales. Se describen como células madre multipotenciales, ya que únicamente son capaces de dar lugar a un pequeño número de células o tejidos, normalmente restringidos a una línea germinativa particular.

En ocasiones las células madre pueden sufrir apoptosis y no participar más en desarrollos posteriores, es el caso de tejidos como el cerebro donde la renovación de células diferenciadas (neuronas y células gliales) es muy baja.

Las células madre embrionarias (CME) son células inmortales, capaces de autorrenovarse perpetuamente en cultivo mientras mantienen un fenotipo indiferenciado y un cariotipo normal (Gerecht-Nir and Itskovitz-Eldor, 2004). Tras la experiencia previa de trabajos realizados con embriones de ratón, en el año 1998 Thomson y cols. consiguieron aislar células madre embrionarias humanas en estado indiferenciado pluripotencial. Son las denominadas células madre embrionarias pluripotenciales (Thomson et al., 1998). Otros autores han empleado células embrionarias germinales primordiales de la cresta gonadal de fetos de 5 a 10 semanas (Matsui et al., 1992). Las células madre embrionarias pluripotenciales pueden dividirse hasta 300 veces y se pueden subcultivar “in vitro” durante un año, sin embargo, las células madre germinales pueden proliferar unas 80 veces (Odorico et al., 2001; Thomson et al., 1998). Han sido múltiples las líneas celulares diferenciadas a partir de células madre embrionarias humanas: células neuronales (Pan et al., 2005), cardiomiocitos (He et al., 2003), células endoteliales y células musculares lisas (Gerecht-Nir et al., 2003), células hematopoyéticas (Cerdan et al., 2004), células osteogénicas (Sottile et al., 2003),

células epidérmicas (Green et al., 2003), células hepatocíticas (Rambhatla et al., 2003) y células productoras de insulina (Segev et al., 2004).

Existen algunos estudios experimentales que han utilizado la administración intraventricular de CME como tratamiento para paliar las secuelas funcionales de la hemorragia cerebral obteniendo resultados positivos (Nonaka et al., 2004). Sin embargo, su utilización con fines terapéuticos, requiere definir y establecer las condiciones de cultivo que permitirán su adecuada diferenciación, mantenimiento y expansión “in vitro”, conservando en todo momento todas las características de célula madre pluripotencial: cariotipo normal, proliferación estable, alta actividad de telomerasa y capacidad de diferenciarse hacia las tres líneas germinales tanto “in vitro” como “in vivo”. Sin embargo, la lógica dificultad de obtención de estas células plantea problemas éticos, técnicos y legales a la hora de su aplicación en clínica.

La utilización de células madre con aplicaciones terapéuticas, requiere definir y establecer las condiciones de cultivo que permitirán su adecuada diferenciación, mantenimiento y expansión “in vitro”, conservando en todo momento todas las características de célula madre pluripotencial: cariotipo normal, proliferación estable, alta actividad de telomerasa y capacidad de diferenciarse hacia las tres líneas germinales tanto “in vitro” como “in vivo”. Con poca frecuencia, las células madre embrionarias experimentan otro proceso conocido como transformación que supone la pérdida del control celular normal y constituye el factor desencadenante inicial de la formación de los tumores cancerígenos lo que también plantea problemas éticos, técnicos y legales a la hora de su aplicación en clínica.

A lo largo de las últimas décadas se ha llegado al conocimiento de que las células madre embrionarias no son la única fuente existente de células madre, potencialmente útiles para la reparación de órganos y tejidos. Diversos autores han demostrado que la administración terapéutica de células madre adultas (CMA) tras una lesión en diferentes órganos permite la reparación tisular y obtener efectos beneficiosos, desde el punto de vista funcional. Estas células residen en nichos específicos o compartimentos tisulares, cuya función es el mantenimiento de la integridad tisular (Vats et al., 2002). Se consideran además, directamente implicadas en la reparación ante una agresión o lesión. Los fenómenos de reparación tisular, implican el reemplazo de los tipos celulares dañados con el fin de restablecer la función e histoarquitectura tisular. Cuando el tejido es alterado en su estructura básica a través de un fenómeno lesivo y se requiere de diversos tipos celulares para su reparación, se pueden activar células pluripotenciales para restaurar el estado tisular previo a la lesión (Weissman et al., 2001). Estas células

presentan algunas ventajas a la hora de aplicarlo a la clínica. Están presentes en distintos tejidos del individuo adulto, como médula ósea, tejido adiposo, cordón umbilical, sistema nervioso, etc.

En los comienzos de la terapia celular, la fuente celular más preciada eran las células madre procedentes del propio tejido lesionado, ya que se trata de obtener células madre de la misma estirpe celular del tejido lesionado. Siguiendo esta lógica, el tipo celular aparentemente más óptimo para la terapia celular en lesiones del SNC se consideró que podrían ser las células madre neurales (CMN).

#### 7.2.- Células madre neurales.

Este tipo celular presenta la capacidad de autorrenovarse y diferenciarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Se han aislado de diversas áreas del cerebro de embriones de ratones y también del sistema nervioso central de animales adultos. En la actualidad, se estudian los posibles usos de estas células en terapia regenerativa tras daño cerebral o enfermedades degenerativas cerebrales, en especial para situaciones de hemorragia o isquemia cerebral y enfermedad de Parkinson (Kennea and Mehmet, 2002). Desgraciadamente, en terapia celular aplicada al sistema nervioso, aparece un gran obstáculo como es, la inherente dificultad de obtención del tipo celular nativo característico del cerebro. La necesidad de fuentes alternativas a las células neurales, ha generado la búsqueda y desarrollo de alternativas, así se ha avanzado en la utilización de células madre adultas procedentes de otros órganos que sean capaces de diferenciarse hacia distintas estirpes celulares.

#### 7.3.- Células madre mesenquimales.

Los progenitores mesenquimales son un grupo de células madres adultas que fueron caracterizadas por primera vez por Friedenstein, quien las aisló de médula ósea y las describió como células adherentes de morfología fibroblastoide, capaces de diferenciarse hacia células de origen mesodérmico como osteocitos, condrocitos y adipocitos (Chang et al., 2006; Friedenstein et al., 1974; Krampera et al., 2006). Varios estudios han asignado a este grupo celular diversos nombres como: Células de Estroma Medular, Unidades Formadoras de Colonias Fibroblastoides, Precursores Estromales ó Células Adultas Progenitoras Multipotentes o MAPCs (Multi-Potent Adult Progenitor Cells).

En el año 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) propuso tres criterios para definir las células madre mesenquimales (CMM):

- Estas células deben ser adherentes en cultivo.
- Expresar los antígenos CD73 (relacionado con mecanismos de adhesión celular), CD90 (marcador de precursor mesenquimal temprano) y CD105 (interviene en la regulación de distintos componentes de la matriz extracelular como fibronectina y colágeno razón por la cual se cree que está relacionada con procesos de angiogénesis y reparación vascular) en ausencia de antígenos hematopoyéticos como CD34, CD45 (marcadores de monocitos, macrófagos y linfocitos B).
- Asimismo, las CMM deben ser capaces de diferenciarse in vitro en osteoblastos, adipocitos y condrocitos bajo condiciones estándar de cultivo.

Además de lo propuesto por ISCT, también se debe tener en cuenta dos aspectos adicionales para clasificarlas como células madre: que las CMM realicen procesos de autorenovación y que sean capaces de desarrollar “plasticidad clonogénica” o diferenciación hacia tejidos de diferentes capas embrionarias como ectodermo y endodermo (Lakshmipathy and Verfaillie, 2005).

La médula ósea es la principal fuente de aislamiento de CMM, aunque se han aislado de tejido adiposo, páncreas, hígado, músculo esquelético, dermis, membrana sinovial, hueso trabecular (Baksh et al., 2004; Kern et al., 2006; Wagner et al., 2005; Wexler et al., 2003), sangre de cordón umbilical (Bieback et al., 2004), tejido pulmonar (Sabatini et al., 2005), pulpa dental y ligamento periodontal (Shi et al., 2005). No obstante, los tejidos más empleados son la médula ósea, la sangre de cordón umbilical y el tejido adiposo. Sobre la obtención de células madre mesenquimales a partir de sangre de cordón umbilical, éste procedimiento requiere optimizar puntos críticos para lograr un cultivo exitoso tales como el tiempo de recolección y procesamiento que debe ser inferior a 16 horas, así como el volumen de sangre recolectado igual o superior a 30 ml. Respecto al aislamiento y cultivo a partir de tejido adiposo, las células obtenidas de esta fuente tienen una elevada capacidad de proliferación y diferenciación in vitro y es posible acceder fácilmente a muestras de tejido adiposo a través de procedimientos como liposucción o abdominoplastia (Kern et al., 2006; Krampera et al., 2006).

En modelos experimentales se ha demostrado que las CMM son capaces de regenerar tejidos deteriorados o lesionados como hueso, cartílago, tejido hepático o miocárdico (Krampera et al., 2006); y modular reacciones inmunes en colagenopatías,

esclerosis múltiple y trasplantes de médula ósea (Rasmusson, 2006). Una de las principales aplicaciones clínicas de las CMM consiste en la reparación de hueso. La diferenciación de CMM a condrocitos se ha realizado en matrices tridimensionales con colágeno y con diferentes polímeros modificados como poliacrílico, poliestireno y polietilenglicol (Guo et al., 2008). Las células mesenquimales también juegan un papel importante en la reparación de tendón usando como transportador colágeno tipo I obteniendo una efectividad del 30% en la reparación del tendón, lo que constituye un avance importante si se considera la complejidad del tejido recuperado (Krampera et al., 2006). En la reparación de miocardio se han postulado diferentes efectos de las CMM sobre el tejido cardíaco como la diferenciación in situ de éstas células en cardiomiocitos, liberación de factores solubles paracrinos que promuevan la proliferación de células residentes de tejido y/o la fusión de células mesenquimales con células cardíacas. Defectos congénitos en el músculo esquelético como distrofia muscular y otras miopatías, pueden ser teóricamente restaurados con un trasplante de CMM que mejora la estructura y función del músculo. CMM obtenidas de la membrana sinovial han mostrado in vivo potencial miogénico en el modelo de ratón con distrofia muscular. Además de las propiedades regenerativas de las células madre mesenquimales, éstas también tienen la facultad de afectar el funcionamiento del sistema inmune. Estudios muestran que las CMM pueden inhibir la proliferación de linfocitos así como la activación a través de anticuerpos anti CD3 y CD28 (Aggarwal and Pittenger, 2005). Desde que las CMM fueron descritas se ha profundizado en su caracterización fenotípica, ontogénica y funcional; sin embargo, aún quedan varios aspectos por dilucidar sobre su biología especialmente en lo relacionado con su regulación a través de nichos o microambientes particulares como la médula ósea o el tejido cardíaco ya que si bien es considerada una población celular particular, su funcionabilidad puede variar dependiendo de la interacción directa con otras células o de la liberación de factores solubles específicos de cada microambiente; por esta razón, es importante estudiar las CMM en el contexto de nichos particulares y no generalizar su uso terapéutico sin considerar las variaciones observadas según de la fuente de obtención, número de células utilizadas y microambiente donde se desean utilizar.

En los últimos años, diversos autores han demostrado que la administración de células madre adultas tras una lesión en el sistema nervioso permite obtener signos de recuperación funcional (Vaquero and Zurita, 2009; Zurita et al., 2008a; Zurita et al., 2008b; Zurita and Vaquero, 2004; Zurita and Vaquero, 2006).



### Células madre mesenquimales de la médula ósea

La médula ósea es un tejido complejo, sinusoidal y bien organizado que se encuentra en la cavidad medular de los huesos largos, del esternón, de los huesos que integran la pelvis y de las vértebras esponjosas. Posee dos poblaciones de células madre bien diferenciadas, células madre mesenquimales y células madre hematopoyéticas. Las primeras, residen en el estroma medular y representan tan sólo del 0.001 al 0.01% del total de la población celular de la médula (Pittenger et al., 1999). Identificadas por primera vez en la rata en el año 1996 por Friedenstein y Petrakova, en humanos generalmente se aíslan de la cresta ilíaca superior de la pelvis (Pittenger et al., 1999) y/o de la tibia o el fémur. Poseen la capacidad de diferenciarse en líneas celulares de tejido conectivo, bien sea de hueso, grasa, cartílago o músculo (Barry and Murphy, 2004). Constituyen el estroma soporte de las células madre hematopoyéticas que se diferencian hacia todas las líneas sanguíneas.

Originariamente, se pensaba que las células madre mesenquimales adultas de la médula ósea (CMMA) eran células capaces de diferenciarse a elementos únicamente procedentes del mesoderma, como osteoblastos, adipocitos y condrocitos o células musculares. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado la capacidad de transdiferenciación que tienen las CMMA. Existe un gran número de evidencias experimentales que apoyan la idea de que las células madre adultas poseen la capacidad de generar distintos tipos celulares especializados, diferentes al de su origen embrionario. Los datos recogidos de la literatura sugieren que las CMMA tienen la capacidad de transdiferenciarse in Vitro hacia células nerviosas (Sanchez-Ramos et al., 2000; Woodbury et al., 2000) característica muy ventajosa en la utilización de estas células como terapia celular en las lesiones del sistema nervioso. Existe una teoría para explicar estos fenómenos en el individuo que se denomina teoría de la transdiferenciación. Esta teoría propone que cada tejido en el individuo adulto contiene un único tipo de células progenitoras específicas cuya función se limita al mantenimiento y reparación del tejido en el que residen (Donovan and Gearhart, 2001). La transdiferenciación ocurre durante la reparación tisular cuando las células progenitoras tisulares específicas derivadas de un órgano, son “reprogramadas” para formar tejidos de otro órgano (Forbes et al., 2002; Poulsom et al., 2002).

Recientemente, nuestro equipo de investigación ha aportado a la literatura datos a favor de que las CMMA del estroma de la médula ósea trasplantadas en lesiones de la médula espinal son capaces de diferenciarse a neuronas e integrarse en el parénquima lesionado, obteniendo signos de recuperación funcional (Vaquero and Zurita, 2009;

Zurita et al., 2008a; Zurita et al., 2008b; Zurita and Vaquero, 2004; Zurita and Vaquero, 2006). Así mismo, se ha comprobado que las CMMA no requieren ser diferenciadas in vitro antes de su implantación en zonas lesionadas del sistema nervioso, pudiendo lograr un efecto funcional positivo, tanto a través de una transdiferenciación local por factores microambientales, como posiblemente, al menos en las fases inmediatas tras el trasplante, por medio de la liberación de factores tróficos capaces de inducir a su vez la proliferación de células madre neurales endógenas. Así, además de la transdiferenciación como mecanismo de acción de las CMMA en la reparación del sistema nervioso, diversos investigadores estudian el papel que juegan las CMMA en la activación de la neurogenesis endógena llevada a cabo por las células madre neurales. CMMA secretan distintos tipos de factores tróficos como BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor), VEGF (Vascular endotelial growth factor), y NGF (Nerve Growth Factor) que aumentan la proliferación celular en las zonas neurogénicas del cerebro.

Además, las células madre mesenquimales procedentes de la médula ósea son relativamente fáciles de aislar y sencillas de manipular in Vitro (Friedenstein et al., 1976). Así mismo, estas células poseen baja antigenicidad, característica que permite la posibilidad de realizar el trasplante tanto autólogo como heterólogo. Por último, no se ha observado ninguna formación de tumores en procesos experimentales a causa de la utilización de células madre mesenquimales procedentes de individuos adultos. Sin embargo, existen aún diversas cuestiones sobre los mecanismos de acción que presentan estas células al participar en la regeneración tisular.

El interés de nuestro grupo de investigación desde hace más de 20 años, se centra en los procesos de regeneración el sistema nervioso. Recientemente, nuestro equipo de investigación ha aportado a la literatura datos a favor de que las CMMA del estroma de la médula ósea trasplantadas en lesiones de la médula espinal son capaces de diferenciarse a neuronas e integrarse en el parénquima lesionado, obteniendo signos de recuperación funcional. Además, se ha comprobado que las CMMA no requieren ser diferenciadas in vitro antes de su implantación en zonas lesionadas del sistema nervioso, pudiendo lograr un efecto funcional positivo, tanto a través de una transdiferenciación local por factores microambientales, como posiblemente, al menos en las fases inmediatas tras el trasplante, por medio de la liberación de factores tróficos capaces de inducir a su vez la proliferación de células madre neurales endógenas (Vaquero and Zurita, 2009; Vaquero and Zurita, 2011; Zurita et al., 2008a; Zurita et al., 2008b; Zurita and Vaquero, 2004; Zurita and Vaquero, 2006).

A pesar de las características terapéuticas anteriormente mencionadas del trasplante de CMMA ninguno de los estudios de terapia celular ha restaurado por completo la función motora y sensorial que se pierde como consecuencia a una lesión del Sistema Nervioso. Este “hándicap” de la terapia celular podría tener su origen en que en los primeros días del trasplante se desencadena un elevado número de procesos apoptóticos en las CMMA trasplantadas promovidos por la presencia del hematoma y procesos inflamatorios presentes en la lesión. La prestación eficiente de células viables en la zona hemorrágica es un requisito importantísimo para repoblar el área lesionada y mejorar así aún más los déficits funcionales.

Por esta razón, en este laboratorio se han llevado a cabo diversos estudios que se centró en la búsqueda de una matriz que permitiera la integración y la migración de las CMMA aumentando así su supervivencia y en consecuencia mejorando los déficits neurológicos. La matriz biológica que se ha utilizado está formada por componentes biocompatibles, al efecto de su posible utilización clínica. Por ello, se utilizaron compuestos que ya están aprobados para su utilización sobre el Sistema Nervioso, en el curso de intervenciones neuroquirúrgicas. Esta matriz biológica consta de un gel derivado de plasma rico en plaquetas cuyos componentes permiten lograr una adecuada densidad de la matriz, capaz de permitir la viabilidad, expansión, migración y transdiferenciación nerviosa de las CMMA.

En los últimos años existe un interés creciente acerca del potencial terapéutico de las células madre adultas. Estas técnicas de terapia celular abren puertas de esperanza a pacientes que sobreviven tras una HIC y permanecen con graves e invalidantes secuelas. La medicina regenerativa ya no considerará tratamientos temporales para enfermedades y lesiones del SN, sino soluciones terapéuticas a largo plazo para una amplia variedad de patologías. La regeneración del SNC mediante técnicas de terapia celular será sin duda una realidad en las próximas décadas, aplicable a las secuelas del daño cerebral hemorrágico.

## **II. HIPÓTESIS**

## **II. Hipótesis**

---

Las hipótesis que sirvieron como planteamiento de este trabajo se describen a continuación:

1. El trasplante de CMMA en animales con secuelas de lesiones hemorrágicas cerebrales sería capaz de influir activamente en la recuperación de dichos déficits, mediante la reparación del tejido cerebral lesionado. Esta reparación podría deberse a la supervivencia e integración de las CMMA trasplantadas en la zona del parénquima lesionado tratando de reemplazar la pérdida celular que sucede tras la lesión cerebral. Estas CMMA trasplantadas deben ser capaces de diferenciarse hacia un fenotipo neural y realizar interacciones funcionales con el resto de las redes neuronales pre-existentes en el tejido. Además, este trasplante debería amplificar la neurogenesis endógena así como potenciar la migración de las células neoformadas a la zona del daño con el fin de integrarse en la zona e interaccionar con las CMMA ya integradas.

2. El desarrollo de una matriz biológica que actúa como soporte de CMMA trasplantadas, podría incrementar la supervivencia in situ de un mayor número de estas células y consecuentemente, asegurar y acelerar los mecanismos de regeneración nerviosa y de recuperación funcional. Esta matriz debería estar formada por un sustrato de aceptada biocompatibilidad, al objeto de su posible aplicación clínica, y debería permitir tanto la transdiferenciación biológica, hacia un fenotipo neural, de las CMMA trasplantadas, como las interacciones anatómicas entre las CMMA ya transdiferenciadas.

### **III. OBJETIVOS**

### III. Objetivos

---

Los Objetivos principales establecidos en este trabajo se detallan a continuación:

1. Diseñar un modelo experimental en rata Wistar de hemorragia intracerebral que resulte en una pérdida parcial de la función motora y sensitiva.

1.1. Desarrollar un protocolo de intervención quirúrgica que derive en la formación de una hemorragia intracerebral controlada y estandarizable en rata.

1.2. Conocer las características fisiopatológicas de la lesión hemorrágica y su evolución a lo largo del tiempo con el fin de determinar el estado de la lesión más óptimo para administrar el tratamiento de CMMA.

2. Establecer un procedimiento de trasplante intralesional de células madre mesenquimales adultas para tratar el accidente cerebrovascular hemorrágico en rata.

2.1. Diseñar un modelo de intervención quirúrgica para la administración intracerebral de CMMA.

2.2. Estudiar histológicamente la supervivencia de las CMMA tras su administración intracerebral en lesiones HIC, su integración en el tejido huésped y su potencialidad de transdiferenciación a células nerviosas.

3. Determinar varios test fiables de valoración de las funciones motoras en rata con la finalidad de comprobar si el tratamiento con CMMA es capaz de disminuir las secuelas neurológicas producidas como consecuencia de la hemorragia cerebral.

4. Comprobar experimentalmente la utilidad del trasplante de CMMA como tratamiento para revertir las secuelas neurológicas de lesiones hemorrágicas, analizando la potencialidad de la administración de una suspensión de CMMA en la lesión cerebral post-hemorrágica como tratamiento para disminuir los déficits funcionales en una fase crónica.

5. Comprobar experimentalmente la utilidad de un soporte biológico derivado del plasma rico en plaquetas. Este objetivo se planteó con la finalidad de aumentar los parámetros de viabilidad celular y con él, la supervivencia celular tras el trasplante intralesional de CMMA.

## **IV. MATERIAL Y MÉTODOS**



## **IV. Material y métodos**

---

### **1.- Animales**

Para el desarrollo de este estudio, se utilizaron un total de 136 ratas Wistar hembra de 10 semanas de vida y 200 gr de peso. Durante el desarrollo del experimento los animales se sometieron a un ambiente climático homogéneo,  $20\pm3$  °C y a una dieta alimenticia con piensos estándar para ratas. Tanto la alimentación como el agua de bebida fueron administradas al libitum. Los animales fueron alojados en jaulas individuales transparentes, provistas de rejillas metálicas con separador de comida y biberón.

### **2.- Modelo experimental de hemorragia intracerebral en rata Wistar**

#### **➤ Material**

- Guía esterotáxica (PanLab, Barcelona, España)
- Morfina 10 unidades internacionales
- Meloxicam 4 unidades internacionales
- Solución antiséptica: Hibimax 5% Clorhexidine (Regent Medical, Burnaby Canada) y curadona (Lainco, S.A. Barcelona, España)
- Sevoflurane Sevorane(Abbot, laboratorios, Madrid, España)
- Bisturí (Braun Vetcare, Alemania)
- Colagenasa Tipo IV (Sigma-Aldrich, Madrid, España).
- Manta térmica.
- Abbocatt 20 G (Porcum, Introcon Safety, Alemania)
- Heparina Hospira (Producción Farmacologica y hospitalaria, S.L)
- Sueroterapia microgoteo (Baxter, Madrid, España)
- Jeringa Hamilton 25 µl (Teknokroma, Barcelona, España)
- Seda trenzada 5-0 (Marin, Murcia, España)

#### **➤ Equipos**

- Microinyector (mod 310 Stoelting Co., Wood Dale, IL,USA)
- Craneotomo (Proxxon, Micromet System)
- Peladora

### ➤ Procedimiento

Para la intervención quirúrgica, los animales se anestesiaron oralmente con una solución compuesta por sevorane al 8% con un flujo de oxígeno de 5 l/min en una cámara de anestesia. Tras comprobar la ausencia de reflejo palpebral, las ratas se colocaron en un aparato esterotáxico. Este sistema es un dispositivo mecánico que inmoviliza totalmente la cabeza del animal lo cual permite alcanzar con precisión cualquier punto del cerebro mediante el cálculo de sus coordenadas registradas en un atlas esterotáxico a partir de un punto de referencia, Bregma, que es el punto de unión entre las suturas coronal y sagital. Tras la administración intraperitoneal de meloxicam (2 mg/kg) y morfina (2.5mg/kg), se colocó una vía en una de las venas laterales del rabo para la administración de suero mediante un sistema de microgoteo a lo largo de toda la cirugía. Posteriormente, se limpió la parte dorsal de la cabeza con curadón y se practicó una incisión en la piel dejando expuesto el cráneo al exterior. A continuación se realizó una craneotomía de 3 mm de diámetro sobre el hueso parietal derecho del cráneo, a la derecha de la sutura bregmática dejando esta libre como punto de referencia para las coordenadas esterotáxicas. A partir de estas coordenadas se determinó el punto de inyección. Las coordenadas seleccionadas para el punto de inyección, el Núcleo Caudado del estriado, fueron: rostrocaudal -0.04 mm (con respecto a Bregma), lateromedial 3,5 mm (con respecto a Bregma) dorsoventral 6 mm (con respecto a la duramadre). La barra de sujeción de los incisivos se situó 2,0 mm por debajo de la línea interaural. Tras la exposición de la duramadre, se realizó una inyección intracerebral de 0.5U de colagenasa tipo IV diluida en 2 µl de suero salino con la ayuda de una jeringuilla Hamilton de 25 µl conectada a su vez a un microinyector. Para evitar incrementos bruscos de la presión intracraneal, la inyección se llevó a cabo a una velocidad constante de 0,4 µl/min. Una vez finalizada la inyección, la jeringuilla se mantuvo en la misma posición durante 1 min para evitar el reflujo del líquido y después se extrajo lentamente. Cuando se finalizó el proceso, la herida fue suturada mediante 6 puntos con seda trenzada (5/0). Los animales se recuperaron de la lesión en una unidad de cuidados intensivos para pequeños animales manteniendo el ambiente con una temperatura de 25°C, una humedad del 40% y un flujo de oxígeno del 3%, realizándose cuidados postoperatorios acordes con su situación clínica y procedimientos diarios de vigilancia.

### **3.- Obtención, expansión y resiembra de las CMMA:**

#### **➤ Material**

- Aguja 20 G (BD Eclipse Needle 256 Lakes, USA)
- Aguja 25 G (BD Eclipse Needle 256 Lakes, USA)
- Jeringuillas de 1 ml (BD Discardit II, Huesca, España)
- Jeringuillas de 2 ml (BD Discardit II, Huesca, España)
- Solución antiséptica: Hibimax 5% Clorhexidine (Regent Medical, Burnaby Canada) y curadón (Lainco, S.A. Barcelona, España)
- Cloruro potásico (Braun Vetcare, Alemania)
- Puntas para micropipetas Daslab (2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl) (Nirco, Barcelona, España)
- Tubos de 2 ml (Eppendorf Research, España)
- Cámara de Neubauer (Brand, Alemania)
- Tubos de 50cc estériles (Falcon, Madrid, España)
- Azul tripán al 0,4% (Sigma aldrich, Madrid, España)
- Pipetas serológicas de 5, 10, 25 cc Daslab (Nirco, Barcelona, España)
- Medio  $\alpha$ .MEM (Gibco BRL Co. Ltd, Grand Island, NY, USA)
- Malla de nylon de 70 micras (Falcon Madrid, España)
- Suero Fetal Bobino (Lonza Verviers Sprl, Bruselas, Bélgica)
- Antibiótico (Lonza Verviers Sprl, Bruselas, Bélgica)
- Tripsina 0.25%/1mM EDTA (Lonza Verviers Sprl, Bruselas, Bélgica)
- Glutamina (Lonza Verviers Sprl, Bruselas, Bélgica)
- Hepes (Lonza Verviers Sprl, Bruselas, Bélgica)
- Placas p60 estériles (Nunc) (Nirco, Madrid, España)
- Sevofluorano Sevoflurane (Abbot, laboratorios, Madrid, España)
- Buffer fosfato salino 10 X (Lonza Verviers Sprl, Bruselas, Bélgica)
- Pipetas Pasteur de vidrio estériles (Daslab Nirco SL, Barcelona, España)
- Cubreobjetos (Menzel-Glaser Braunschweig, Barcelona, España)
- Frascos de cultivo estériles de 75 cm<sup>2</sup> Nunc (Thermo scientific Madrid, España)

#### **➤ Equipos:**

- Incubador de CO<sub>2</sub> Autoflow (Nuaire, Plymouth, USA)
- Campana de flujo laminar (Nuaire, Plymouth, USA)
- Pipeteador automático (Bibbyjet pro, OSA, UK)

- Estufa a 37°C (Memert, Fisher Scientific, España)
- Microscopio de luz invertida (Euromex Holanda)
- Centrífuga de sobremesa Hemle Z300K (Fisher scientific, Madrid, España)
- Microscopio de contraste de fases (Olympus, España)
- Micropipetas (2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl) (Eppendorf Research, España).
- Baño termostático a 37°C con agua estéril (Grant, Cambridge, United kingdom)

➤ Medios de cultivo:

Medio de cultivo de recolecta

- Medio  $\alpha$ -MEM
- Suero Fetal bovino 2.5 %
- Solución antibiótica al 1,2 %

Medio de cultivo de siembra

- Medio  $\alpha$ -MEM
- L-Glutamina al 2,2 %
- Solución antibiótica 1,2 %
- HEPES al 2,2 %
- Suero Fetal bovino 20 %

Medio de cultivo de expansión

- Medio  $\alpha$ -MEM
- L-Glutamina al 2,2 %
- Solución antibiótica 1,2 %
- HEPES al 2,2 %
- Suero Fetal bovino 10 %

➤ Procedimiento.

La obtención de las CMMA se realizó mediante la extracción de médula ósea de ratas macho Wistar entre 200-250g de peso. Para el desarrollo de este procedimiento se preparó la campana de flujo laminar 30 minutos antes de trabajar. En el quirófano experimental se durmió al animal con una solución compuesta por Sevoflurane al 8% con un flujo de oxígeno de 5 l/min y se le sacrificó con una inyección intracardiaca de cloruro potásico. Tras rasurar las extremidades y bañarlas con solución antiséptica, se extrajeron bajo condiciones asépticas las dos tibias y los fémures. Después de lavarlos

con PBS se situaron en un tubo de 50 cc con medio de recolecta previamente atemperado a 37°C en el baño termostático. Bajo campana, se extrajeron las tibias y los fémures del tubo de 50 cc y se lavaron en una placa p60 con medio de recolecta previamente atemperado a 37°C en la estufa. Una vez limpias se pasaron a otra placa p60 con medio de recolecta a 37°C. Con una jeringuilla de 2 cc vacía y una aguja de 20G se perforaron las epífisis de todos los huesos. A continuación, se hizo pasar el medio de cultivo de siembra por las epífisis a través de todo el hueso extrayendo así el contenido de la diáfisis. Posteriormente, se recogió la médula ósea en la tercera placa. Una vez lavado el contenido de los huesos, se rompieron las epífisis con la ayuda de un mosquito y se rascó la diáfisis que no se había extraído mediante lavado. Cuando finalizó el raspado, se homogeneizó el medio completamente con una micropipeta. Después se filtró la solución con un filtro de 70 micras para eliminar los restos óseos y se resuspendieron las células en 5-10 ml de medio de cultivo de siembra. Finalmente, la suspensión celular obtenida se sembró en un frasco de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> con 20 cc de medio de siembra. Se incubaron los frascos en un incubador de CO<sub>2</sub>, al 5%, a 37°C y 100% de humedad.

A las 72 horas de incubación, se eliminó el sobrenadante conteniendo restos celulares y células no adherentes, de forma que las células mesenquimales permanecen en el frasco por ser células característicamente adherentes. Posteriormente el cultivo se lavó al menos dos veces con buffer fosfato salino 1X pH:7.4 estéril, añadiendo a continuación 12 cc de medio de siembra, que se reemplazó cada 48-72 horas, durante 14 días. Cuando las células alcanzaron una confluencia aproximada del 90% se levantaron del frasco de cultivo mediante el método de tripsinización (el control del crecimiento celular de los cultivos se llevó a cabo mediante la observación de los frascos de cultivo con un microscopio óptico invertido de contraste de fases).

Las células se sometieron a una incubación con 3 ml de tripsina 0.25%/1mM EDTA durante 4-5 minutos a 37°C. Tras este periodo de incubación se inactivó la tripsina con 6 ml de medio de lavado. Las células obtenidas se centrifugaron 2 veces a 1200 rpm durante 10 minutos. A continuación se diluyó el "pellet" obtenido en medio de expansión y se sometió a recuento mediante el test de viabilidad de azul tripán. Finalmente el recuento, las células madre se cultivaron de nuevo en frascos de 75 cm<sup>2</sup> en una concentración de 8000 células/cm<sup>2</sup> en presencia de 12cc de medio de expansión.

Para el recuento de las CMMA se recogió una alícuota de 200 µl de la suspensión celular en solución de medio de expansión y se añadió 200 µl de azul de tripán al 0,4%.

Se mezcló cuidadosamente y se cargaron 20 µl de la muestra en una cámara de Neubauer y se procedió al recuento con objetivo de 40 aumentos. Se contaron las células viables (no teñidas) y las no viables (teñidas de azul).

El recuento final de las células se obtuvo mediante la aplicación de la siguiente fórmula:

$$N = \frac{(A+B+C+D)}{4}$$

- Donde A, B, C y D son el número celular contado en cada una de las cuatro cuadrículas que forman la cámara.
- Donde N es la media del número de células obtenido entre las 4 cuadrículas.

Número total de células =  $0, N \times 10^6 \times \text{factor de dilución con el azul tripán} \times \text{ml totales de muestra}$ .

La viabilidad se obtuvo mediante la aplicación de siguiente fórmula y hallando la media de las 4 cuadrículas:

$$\text{Viabilidad} = \frac{\text{Células viables}}{\text{Células viables} + \text{Células no viables}}$$

#### **4. - Caracterización fenotípica de las CMMA por citometría de flujo.**

Este procedimiento tiene como objetivo asegurarse que las CMMA utilizadas para el trasplante presentan de forma homogénea una caracterización fenotípica propia de células mesenquimales antes de su infusión en el animal receptor. Así mismo, fue importante comprobar la ausencia de células de estirpe hematopoyéticas en la muestra de CMMA. La caracterización de las células se llevó a cabo mediante citometría de flujo.

Los Materiales utilizados para identificar fenotípicamente las células madre mesenquimales mediante citometría de flujo se describen a continuación:

##### **➤ Material**

- Tubos cónicos 5 ml (AFORA, Fisher scientific, Madrid, España)
- Tubos de citometría (IZASA Barcelona, Madrid)
- Running buffer de lavado (MILTENYI, Alemania)
- Flow check (IZASA, Barcelona, Madrid)

- Isotipo IgG (H) FITC: (AbD Serotec Oxford UK)
- Isotipo IgG1 PE: (AbD Serotec Oxford UK)
- Isotipo IgG1 AL.647: (AbD Serotec Oxford UK)
- CD29 FITC (IgG(H)) (AbD Serotec Oxford UK)
- CD11b FITC (IgG2a) (AbD Serotec Oxford UK)
- CD49e AL.647 (IgG(H)) (AbD Serotec Oxford UK)
- CD90 PE (IgG1) (AbD Serotec Oxford UK)
- CD31 AL.647 (IgG1) (AbD Serotec Oxford UK)
- CD 45 PE (IgG1) (AbD Serotec Oxford UK)
- Reactivo de viabilidad Live and Dead (Invitrogen Oxford UK)

➤ Equipos

- Citómetro de flujo (Beckman Coulter, Cytomics FC 500 MPL)
- Micropipetas (2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl) (Eppendorf Research, España).

➤ Procedimiento

Para el desarrollo de este procedimiento inicialmente se centrifugaron 5 tubos cónicos de 5 ml con  $3 \times 10^5$  CMMA y 1 ml de Running Buffer a 1250 rpm durante 6 minutos a una temperatura de 4°C. Finalizada la centrifugación, se decantó el sobrenadante y se marcaron las CMMA durante 30 minutos a 4°C con 100 µL de anticuerpos que se prepararon previamente según la tabla que se describe a continuación:

TUBO	MARCAJE FITC	MARCAJE PE	MARCAJE AL647	RUNNING BUFFER
1	IgG-h (2,5µL)	IgG1 (2,5µL)	IgG-h (2,5µl)	92,5 µl
2	CD29 (2,5µL)	CD90 (1,5µL)		96 µl
3	CD29 (2,5µL)	CD45 (2,5µL)	CD49e (2,5µl)	92,5 µl
4	CD11b (2,5µL)	CD90 (2,5µL)	CD31 (2,5µl)	92,5 µl
5	CD11b (2,5µL)	CD45 (2,5µL)		95 µl

\* A todos los tubos se les añadió 1µL del reactivo de viabilidad Live and Dead.

Posteriormente se centrifugaron las CMMA a 1250 rpm durante 6 minutos a una temperatura de 4°C. Tras decantar el sobrenadante, se les añadió 500µl de Running Buffer y una vez pipeteada la mezcla se traspasó el contenido de los tubos cónicos a tubos especializados de citometría de flujo.

Antes de proceder al análisis de las CMMA se realizó un lavado de los conductos del citómetro de flujo con medio de lavado. Así mismo, se realizó una calibración previa al análisis de las CMMA con perlas marcadas con una mezcla de fluorocromos (flow check) que fueron excitados por los rayos laser UV, verde, violeta, rojo y azul y que emiten fluorescencia reconocida por los detectores empleados. Esta calibración tiene como finalidad maximizar la resolución y establecer el ruido de fondo para descartarlo de los ensayos realizados, estableciendo un nivel base (línea base) para la detección de fluorescencia, permitiendo la apropiada discriminación de poblaciones positivas y negativas con la menor interferencia y la mejor reproducibilidad de los resultados. Posteriormente, las células se analizaron con el protocolo de citometría de flujo adecuado. Una vez adquiridas las células, se procedió a su análisis para determinar el porcentaje de la expresión de los antígenos de superficie de las CMMA. Se consideró apto porque la expresión de los marcadores positivos CD90 y CD49 fue mayor del 95%. Además, la expresión de los marcadores negativos CD31 y CD 34 fue menor del 5%.

#### **5.- Protocolo de obtención de plasma rico en plaquetas**

En el preparado obtenido observaremos un enriquecimiento plaquetario. Según Marx y Meltzer (2000), el PRP óptimo es aquél cuyo concentrado de plaquetas sea 4 veces mayor que el recuento inicial, unas 106 plaq/ $\mu$ l. El protocolo escogido para la obtención del PRP es el propuesto por el Dr. Anitua (1999) (Anitua, 1999). El cual, es un método fácil de reproducir en un centro hospitalario.

##### **➤ Material**

- Agujas de 20 G (BD Eclipse Needle, Lakes, USA)
- Agujas de 25 G (BD Eclipse Needle, Lakes, USA)
- Jeringuillas de 1 ml (BD Discardit II, Huesca, España)
- Jeringuillas de 2 ml (BD Discardit II, Huesca, España)
- Heparina Hospira (Producción Farmacologica y hospitalaria, S.L)
- Puntas de micropipeta estériles Daslab (Nirco, Madrid, España)
- Tubos de 2 ml de capacidad estériles (Eppendorf, Madrid, España)
- Cloruro cálcico al 10% (Sigma Aldrich, Madrid, España)
- Trombina (Sigma Aldrich, Madrid, España)

##### **➤ Equipo**

- Centrifuga (Hemle Z300K) (Fisher scientific, Madrid, España)
- Micropipetas (2-20  $\mu$ l, 20-200  $\mu$ l, 100-1000  $\mu$ l) (Eppendorf Research, España)



➤ Procedimiento.

Al objeto de realizar un trasplante de plasma rico en plaquetas autólogo, la obtención del plasma se llevó a cabo en los animales previamente lesionados. Para ello, se durmió al animal en el quirófano con Sevorane al 8% con un flujo de Oxígeno de 5 l/ minuto. Tras extraer 500 µl de sangre mediante una jeringuilla y una aguja, previamente heparinizada para evitar así fenómenos de coagulación sanguínea, se traspasó la sangre a un tubo de 2 ml de capacidad. A continuación, se realizaron sucesivas centrifugaciones en posición simétrica para que existiera equilibrio rotacional en el interior de la centrífuga, separando así las fracciones sanguíneas de menor a mayor densidad. Las muestras se centrifugaron a 4100 G durante 15 minutos para separar el plasma y los leucocitos de los hematíes sanguíneos. Finalizados los 15 minutos de centrifugado, se colocaron los tubos en la gradilla y, mediante micropipeteado, se aspiró de forma progresiva el sobrenadante que cubre el sedimento de elementos formes sanguíneos (hematíes) transvasándolo a otro tubo y centrifugándolo a 300 G durante 6 minutos para separar el plasma de los leucocitos. Mediante pipeteado, se aspiró de forma progresiva el plasma y se traspasó a otro tubo que se sometió a una tercera y última centrifugación a 4600 G durante 15 minutos para obtener las plaquetas concentradas en la parte inferior del tubo, de donde se obtuvieron 30 µl de PRP.

Paralelamente, en otro tubo se elaboró una solución de 30 µl de cloruro cálcico (34ngr/ml) y trombina (100U/ml).

**6.- Modelo de trasplante intralesional de CMMA:**

➤ Material

- Guía esterotáxica (PanLab, Barcelona, España)
- Morfina 10 unidades internacionales
- Meloxicam 4 unidades internacionales
- Solución antiséptica: Hibimax 5% Clorhexidine (Regent Medical, Burnaby Canada) y curadona (Lainco, S.A. Barcelona, España)
- Sevofluorano Sevorane (Abbot, laboratorios, Madrid, España)
- Bisturí (Braun Vetcare, Alemania)
- Sistema de sujeción de doble jeringuilla.
- 2 jeringuillas de 1 ml (BD Discardit II, Huesca, España)
- Cateter (BD Eclipse Needle, Lakes, USA)
- Manta térmica.

- Abbocatt 20 G (Porcum, Introcon Safety, Germany)
- Heparina Hospira (Producción Farmacologica y hospitalaria, S.L)
- Sueroterapia microgoteo (Baxter, Madrid, España)
- Meloxicam 4 unidades internacionales
- Seda 5-0 (Marin Murcia, España)
- $5 \times 10^6$  células madre mesenquimales adultas en plasma rico en plaquetas por animal (n=10)
- $5 \times 10^6$  células madre mesenquimales adultas en suero salino por animal (n=10)
- 30  $\mu$ l de plasma rico en plaquetas por animal (n=10)
- 30  $\mu$ l de suero salino por animal (n=10)
- 30  $\mu$ l de mezcla de cloruro cálcico (34ngr/ml) y trombina (100U/ml) por animal (n=20)

#### ➤ Equipos

- Microinyector (mod 310 Stoelting Co., Wood Dale, IL,USA)

#### ➤ Procedimiento

1. Al objeto de conocer la evolución de la lesión del modelo experimental utilizado en este trabajo se sometió a una hemorragia intracerebral a 48 animales sacrificándolos en diferentes momentos evolutivos de la fase aguda de la lesión (24, 48, 72 horas, 7, 14, 21, 28 días, 6 meses y 12 meses) (n=8 animales participaron en cada grupo).

2. Al objeto de conocer el comportamiento del trasplante de CMMA en fase aguda se sometió a 48 animales lesionados a un trasplante de CMMA en suero salino sacrificándolos en diferentes momentos evolutivos de la lesión (24, 48, 72 horas, 7, 14, 21 días) (n=8 animales participaron en cada grupo).

3. Con el objetivo de comprobar la efectividad funcional del trasplante de CMMA en un modelo animal de hemorragia intracerebral, tras 2 meses de evolución de la lesión y por medio de una nueva intervención quirúrgica bajo anestesia general, se sometió a 40 animales a los siguientes tratamientos:

3.1.- Grupo experimental trasplantado intralesionalmente con CMMA diluidas en suero salino. Este grupo formado por hembras adultas de ratas Wistar (n=10) fue sometido a una hemorragia intracerebral. A los dos meses se realizó un trasplante de  $5 \times 10^6$  CMMA alogénicas diluidas en suero con un volumen final de 30  $\mu$ l. Al objeto de minimizar el daño cerebral inherente a la administración de CMMA se inyectaron las

células en suero salino de forma uniforme y lenta mediante un microinyector asociado a una guía esterotáxica.

3.2.- Grupo experimental control con una inyección en suero salino. 10 animales con una lesión similar que el grupo anterior fueron sometidos a una inyección de un volumen de suero salino proporcional al volumen de la cavidad hemorrágica (30µl) utilizando las mismas coordenadas que para la inducción de la lesión hemorrágica.

3.3.- Grupo experimental trasplantado intralesionalmente con CMMA en un gel derivado de PRP. La matriz biológica que se utilizó para el modelo de trasplante celular está formada por componentes biocompatibles, al efecto de su posible utilización clínica en pacientes. Por ello, se utilizaron compuestos que ya están aprobados para su utilización sobre el Sistema Nervioso, en el curso de intervenciones neuroquirúrgicas. La matriz biológica que se utilizó fue un gel cuyos componentes permitieron lograr una adecuada densidad de la matriz, capaz de permitir la viabilidad, expansión, migración y transdiferenciación nerviosa de las CMMA. Este grupo experimental está formado por diez animales lesionados que a los dos meses fueron sometidos a una inyección estereotáxica de 30µl de 5x10<sup>6</sup> CMMA embebidas en un gel derivado de plasma rico en plaquetas. El sistema de inyección que se utilizó fue un kit estéril conectado a un guía esterotáxica que consta de dos jeringas de 1 ml que se conecta en su parte inferior mediante un catéter final que termina en una aguja 24G. Una jeringa contenía 25 µl de la solución de Cl<sub>2</sub>Ca (34ngr/ml) y trombina (100U/ml). La otra jeringa contenía 5x10<sup>6</sup> CMMA alogénicas disueltas en el PRP también alogénico. Utilizando una bomba de microinyector 15 µl de cada una jeringa fueron inyectados simultáneamente en el cuerpo estriado durante un período de 5 minutos (Coordenadas: 0,04 mm por detrás, 3,5 mm lateral, ventral 6mm). El gel derivado de plasma rico en plaquetas que contiene las CMMA se polimerizó directamente en la zona lesión.

3.4.- Grupo control sometido a una administración del gel derivado de PRP. Hembras adultas de ratas Wistar lesionadas mediante una HIC (n=10) fueron sometidas a una inyección estereotáxica de 30µl del gel derivado de PRP mediante el sistema que se ha descrito anteriormente en las Coordenadas: 0,04 mm anterior, 3,5 mm lateral, 6 mm ventral, durante un período de 5 minutos.

Los animales se dejaron evolucionar hasta 6 meses después del trasplante, al objeto de conocer las modificaciones histológicas progresivas en el cerebro, tras el implante de las CMMA.

## **7.- Test de valoración de la funcionalidad sensitiva y motora.**

Teniendo en cuenta el objetivo de este estudio, de lograr la recuperación funcional por la administración de CMMA, ha sido necesaria la optimización y adecuación de tres sistemas de valoración de las funciones motoras y sensitivas: un sistema de video-grabación en campo abierto (VTB-test), test de valoración sensitivo-motora y test del rotarod treadmill al objeto de una evaluación más precisa de la recuperación funcional de los animales tras esta forma de terapia celular.

En este estudio se realizaron 3 sesiones de valoración funcional del animal sano. Estas valoraciones sirvieron para obtener datos concretos sobre el comportamiento del animal en condiciones normales. Estos datos se tomaron como referencia a la hora de analizar los déficits funcionales de los animales posteriores a la lesión cerebral. Además, estas valoraciones sirvieron de entrenamiento animal para los test rotarod y valoración sensitivo-motora. Los datos se muestran como la media  $\pm$  la desviación estándar de las tres medidas de valoración. Posteriormente a la lesión cerebral y al trasplante se efectuaron sesiones de valoraciones cada quince días durante los 8 meses de duración del estudio (2 meses de cronicidad de la lesión y 6 de evolución del trasplante). Los datos se muestran como la media mensual  $\pm$  la desviación estándar.

### ➤ Material

- Caja VTB (Panlab, Barcelona, España)
- Software Smart (PanLab Harvard Apparatus, Holliston, Mass., USA)
- Ordenador de mesa.
- Viga de madera
- Rotarod Treadmill (Lab-line Instruments, Inc., Melrose Park, IL)

### ➤ Procedimiento

- Sistema de video-grabación en campo abierto (VTB)

El software Smart es un sistema de video capaz de evaluar el comportamiento que presentan los animales de experimentación. Este sistema permite analizar actividad, trayectorias, interacciones sociales y realiza un amplio procesamiento de datos. Video-Tracking-Box (VTB) es una cámara experimental basada en el software Smart y desarrollada con la finalidad de optimizar estudios de actividad locomotora (Otero et al., 2010b). En este estudio se evaluó a los animales estudiando un parámetro neurológico

que es la actividad locomotora. Cuando los animales se situaron en la cámara de metacrilato, el software Smart analizó durante 90 segundos la dirección que llevaban los animales sobre la lámina transparente de metacrilato. Con el fin de estudiar todos los parámetros comportamentales relacionados con una lesión cerebral, el software Smart analizó la actividad locomotora, parámetro que incluye la distancia que los animales son capaces de recorrer en los 90 segundos que se graba al animal.

- Test de valoración sensitivo-motora (NSS)

Consiste en una escala de 0 a 14 puntos donde que permite identificar y cuantificar distintos parámetros de disfunción motora y sensorial de un animal (Li et al., 2001). Los puntos que conforman la escala son los siguientes:

Test de equilibrio en la viga (Normal=0, Máximo=6)

1. Mantener el equilibrio con postura firme
2. Agarrarse al costado de la viga
3. Abrazado a la viga y 1 de los miembros cae de la viga
4. Abrazado a la viga y 2 de los miembros caen de la viga o gira en la viga (>60 seg)
5. Conseguir el equilibrio en la viga pero cae fuera (>40 seg)
6. Conseguir el equilibrio en la viga pero cae fuera (>20 seg)
7. Caer fuera; no consigue el equilibrio o queda colgado de la viga (< 20 seg)

Sostener al animal en el aire (Normal=0, Máximo=3)

8. Flexión de los miembros traseros
9. Flexión de los miembros delanteros
10. Rotado

Situar al animal en el suelo (Normal=0, Máximo=3)

11. Inhabilidad para caminar recto
12. Circular hacia el lado parético (sin fuerza)
13. Caerse hacia el lado parético (sin fuerza)

Test de orientación (Visual y Táctil) (Normal=0, Máximo=1)

Test propioceptivo (sensibilidad profunda) (Normal=0, Máximo=1)

- Rotarod treadmill

El rotarod es un sistema de valoración objetivo ampliamente utilizado y aceptado en la literatura para estudiar el equilibrio y la coordinación de los animales en distintos modelos experimentales. Consiste en un rodillo que acelera de forma constante sobre el que se coloca a un animal. El sistema es capaz de cuantificar el tiempo en el que el animal se mantiene sobre él. Un animal con déficits en el equilibrio y en la coordinación de sus miembros traseros y delanteros tendrá mayor dificultad para mantenerse sobre el rodillo aguantando menos tiempo sobre él.

## **8.- Obtención y preparación del tejido.**

### **➤ Material**

- Sevofluorano Sevorane (Abbot, laboratorios, Madrid, España)
- Oxígeno (Air liquide, España)
- Jeringuillas de 5 ml (BD Discardit II, lakes USA)
- Aguja de 20G (BD Eclipse Needle, lakes USA)
- Cloruro Potásico (Braun Vetcare, Alemania)
- Bisturí (Braun Vetcare, Alemania)
- Cloruro Sódico (Sigma Aldrich, Madrid, España)
- Paraformaldehído al 4% (Merck kGaA, Alemania)
- Buffer fosfato salino (Lonza Verviers Sprl, Bruselas, Bélgica)
- Alcohol (100°, 96°, 70°) (Panreac química Sau, Barcelona, España)
- Xilol (Merck kGaA, Alemania)
- Parafina (Shandom histoplast, Thermo scientific, Madrid, España)
- Portas (Thermo scientific, Madrid, España)
- 3-aminopropyl-triethoxysilane (Sigma Aldrich, Madrid, España)

### **➤ Equipos**

- Baño termostático (Grant Cambridge, United kingdom)
- Micrótopo (Leitz Wetzlar 1512, Histosearch, Minnesota, USA)
- Estación de parafina (AP 280-1)

## ➤ Procedimiento

Una vez terminada la evolución del estudio, los animales fueron anestesiados oralmente con una solución de Sevorane al 8% con un flujo de oxígeno de 5 l/min. Tras comprobar la ausencia de reflejo palpebral, se sacrificó a los animales mediante una inyección intracardiaca de Cloruro potásico en el ventrículo izquierdo. Acto seguido se procedió a la extracción del cerebro lavándolo con una solución compuesta de cloruro sódico al 0,9% en H<sub>2</sub>O. A continuación el tejido se fijó en una solución compuesta por paraformadehído al 4% (p/v) en PBS durante 24 horas.

Tras la fijación, los cerebros se seccionaron en bloques coronales y se mantuvieron sumergidos en la misma solución fijadora durante 2 horas. Los restos de solución fijadora se eliminaron con varios lavados de 1 hora en H<sub>2</sub>O. Posteriormente, los bloques de tejido se deshidrataron en un gradiente de alcoholes (Alcohol de 70° durante 30 minutos, alcohol de 96° durante 90 minutos y alcohol de 100° durante 30 minutos). Una vez deshidratados los bloques de cerebros fueron sometidos a un tratamiento con Xilol (15 minutos) para eliminar todo el alcohol. Acto seguido, los cerebros se sumergieron en parafina líquida durante 4 horas con el objetivo de rellenar los espacios de los tejidos intra y extracelulares con el fin de otorgar consistencia para la posterior microtomía. Por último se realizó un bloque de parafina consistente en el que se incluyó el tejido.

Con el objetivo de conseguir cortes lo suficientemente finos del tejido incluido para su posterior visualización con el microscopio óptico, las piezas en parafina que correspondían con la zona de lesión se cortaron a 4 µm de grosor en un micrótopo. Para ello, se colocó previamente un bloque de parafina del refrigerador de la estación de parafina y se eliminaron los restos de parafina de su periferia. Una vez frío el bloque, se orientó en el porta bloques y se desbastó la parafina superficial con cortes de un grosor de 20 µm hasta conseguir un corte uniforme en el que apareció toda la superficie del tejido. En este momento se procedió a cambiar el grosor del corte a 4 µm para obtener cortes finos que se recogieron con un pincel y se depositaron en el baño. Una vez estirados se recogieron los cortes seriados, ordenados rostrocaudalmente, con portas numerados y tratados previamente con 3-aminopropyl-triethoxysilane. A continuación, se secaron en la estufa los cortes de tejido a 56°C durante 1-2 horas y a 37°C durante toda la noche.

## 9.- Estudios histológicos

### 9.1.- Hematoxilina-Eosina

En todos los casos se estudiaron cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina para evaluar los cambios del tejido en los diferentes tiempos tras la lesión.

#### ➤ Material

- Cestillo para las preparaciones
- 15 Cubetas histológicas
- Xilol (Merck kGaA, Alemania)
- Alcohol (100°, 96°, 70°) (Panreac química Sau, Barcelona, España)
- H<sub>2</sub>O destilada (Serrasol laboratorios España)
- Hematoxilina (Analema España)
- Eosina (Merck kGaA, Alemania)
- Cubreobjetos (Menzel-Glaser Brainschweig, Alemania)
- Medio de montaje soluble en Xilol (Sigma Aldrich, Madrid, España)
- Medio de montaje Glicerol (Merck, Madrid, España)
- Guantes (Kendall, Massachusetts, USA)

#### ➤ Equipos

- Campana de extracción de vapores (Grumair)

#### ➤ Procedimiento

El objetivo de este procedimiento fue realizar una primera tinción de los tejidos para poder estudiar las estructuras más importantes. Primeramente se desparafinaron las muestras introduciendo el cestillo en las tres cubetas con xilol durante 15 minutos cada una. Las muestras se rehidrataron por inmersiones secuenciales de alcohol de 100° (3 cambios de 10 minutos), 96° (1 cambio de 5 minutos), 70° (1 cambio de 5 minutos). Posteriormente se tiñeron las muestras con hematoxilina (15 minutos). Seguidamente se eliminó el exceso de tinción con H<sub>2</sub>O destilada. El cestillo se introdujo en la cubeta con eosina durante tres minutos y se eliminó el exceso con alcohol 96°. Se deshidrató el tejido en alcohol 100° (durante 5 minutos) y se aclaró con xilol (5 minutos). Por último, se montaron las preparaciones con un cubreobjetos en un medio de montaje.



## 9.2.- Inmunohistoquímica convencional

El desarrollo de técnicas de inmunohistoquímica ha permitido la identificación, sobre muestras tisulares o citológicas, de determinantes antigénicos característicos de distintas líneas de diferenciación, proliferación y muerte celular. La aplicación directa de anticuerpos policlonales o monoclonales sobre secciones tisulares permitió la localización microanatómica de su expresión y su correlación con los parámetros morfológicos, aumentando la sensibilidad y especificidad del estudio y proporcionando información adicional esencial.

### ➤ Material

- Cestillo para las preparaciones
- 15 Cubetas histológicas
- Xilol (Merck kGaA, Alemania)
- Alcohol (100°, 96°, 70°) (Panreac química Sau, Barcelona, España)
- H<sub>2</sub>O destilada (Serrasol laboratorios España)
- Hematoxilina (Analema España)
- Eosina (Merck kGaA, Alemania)
- Guantes (Kendall, Massachusetts, USA)
- Anticuerpos 1<sup>arios</sup> (ver tabla 1)
- Anticuerpos 2<sup>arios</sup> (ver tabla 1)
- Suero horse (Vector laboratorios Burlingame CA)
- Suero goat (Vector laboratorios Burlingame CA)
- Suero rabbit (Vector laboratorios Burlingame CA)
- Peróxido de hidrógeno al 30% (Sigma-Aldrich, Madrid, España)
- Metanol (Panreac, Barcelona, España)
- Buffer fosfato salino (Lonza Verviers Sprl, Bruselas, Bélgica)
- 3, 3' diaminobencidina (Sigma- Aldrich, Madrid España)
- Vectastain ABC reagent. Vector (Kit Vectastain Elite Pk-6200 Universal, Vector Laboratorios, Burlingame CA)
- Cubreobjetos (Menzel-Glaser Braunschweig, Barcelona, España)
- Medio de montaje (Sigma Aldrich, España)
- Medio de montaje Glicerol Mowiol (Merck, kGaA, Alemania)

➤ Equipos

- Microscopio ((Optimas 6.2, Bothell, WA,USA))
- Campana de extracción de vapores (Grumair)

➤ Soluciones

Solución de inactivación de la peroxidasa endógena (10 ml):

- 1ml metanol
- 1ml PBS 10x
- 7 ml H<sub>2</sub>O
- 1ml peróxido de hidrógeno al 30%

Solución de bloqueo (10 ml)

- 0.4 gr de BSA
- 500 µl Horse
- 10 µl Tritón
- 9490 µl Buffer Phosfato Saline

Solución de desenmascaramiento antigénico: Buffer citrato (Ph=6)

- Solución A: 0.1M Solución de ácido cítrico (21.01gr en 1000ml)
- Solución B: 0.1M Solución de citrato sódico (29.41gr C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub> x 2H<sub>2</sub>O en 1000 ml)
- Se mezclan 95ml de Solución A con 41.5ml de Solución B y se completan hasta 1000 ml con H<sub>2</sub>O.

Solución de desenmascaramiento antigénico: PBS-Tritón 0.1%

- 10 µl Tritón
- 10 ml de PBS

**TABLA 1. Anticuerpos utilizados**

NOMBRE DEL AC	CASA COMERCIAL	USO	Tipo
Anti-KI-67	Master Diagnostica	1:200	1 <sup>ario</sup>
Anti-PGFA	Lab Vision Neomarker	1 µg/ ml	1 <sup>ario</sup>
Anti-Doblecortina	Santa Cruz	1:200	1 <sup>ario</sup>
Anti-Nestina	Chemicon	1 µg/ml	1 <sup>ario</sup>
Anti-B-III Tubulina	Chemicon	1:100	1 <sup>ario</sup>
Anti-neurofilamentos	Serotec	1:100	1 <sup>ario</sup>
Anti-CD68	Serotec	1:300	1 <sup>ario</sup>
NeuN	Chemicon International	1:500	1 <sup>ario</sup>
Anti-Mouse	Vector laboratorios	1:200	2 <sup>ario</sup>
Anti-Rabbit	Jackson	1:200	2 <sup>ario</sup>
Rhodamina Anti-Rabbit	Jackson	1:200	2 <sup>ario</sup>
Cyanina Anti- Mouse	Jackson	1:200	2 <sup>ario</sup>

#### 9.2.1.- Procedimiento de inmunohistoquímica con DAB

La tinción inmunohistoquímica se realizó sobre las muestras histológicas del tejido. Una vez obtenidas las secciones de tejido, se llevó a cabo la detección de diferentes antígenos.

Para proceder a realizar la inmunohistoquímica, las preparaciones se desparafinaron y rehidrataron por inmersiones secuenciales en xilol (3 cambios de 15 minutos), etanol (alcohol 100%: 3 cambios de 10 minutos; alcohol 96%: 5 minutos y alcohol 70%: 5 minutos) y H<sub>2</sub>O durante 10 minutos. La peroxidasa del tejido se inactivó tras la incubación del tejido en una solución de inactivación de la peroxidasa endógena durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, los cortes se lavaron 3 veces en PBS durante 5 minutos. A continuación se realizó un desenmascaramiento antigénico mediante la digestión proteolítica con enzimas y calor (solución de desenmascaramiento antigénico) y se compensó la pérdida de antigenicidad que ocasiona el fijador formol. Subsecuentemente, las muestras se bloquearon con solución de bloqueo durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron con los anticuerpos primarios específicos (tabla 1) durante 24 h a 4°C. Estos anticuerpos primarios se diluyeron en solución de bloqueo. Tras volver a lavar las secciones (3x5

min) con PBS-Tritón 0,1%, se realizó la incubación con el anticuerpo secundario (tabla 1) diluido en la solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras la incubación las muestras se lavaron 3 veces durante 5 minutos cada una con PBS-Tritón. Como sistema de detección se adicionó el complejo de avidina-biotina durante 45 minutos a temperatura ambiente. Las preparaciones se lavaron en 3 veces durante 5 minutos con PBS-Tritón 0,1%. El Cromógeno utilizado fue 3' diaminobencidina (DAB). La reacción se controló al microscopio y se detuvo, mediante 2 lavados de 10 min de H<sub>2</sub>O, cuando se alcanzó la tinción óptima de elementos positivos respecto a la tinción inespecífica de fondo. El exceso de DAB se limpió con agua destilada durante 10 min. Posteriormente, las muestras se contrastaron con Hematoxilina durante 5 minutos y se lavaron en H<sub>2</sub>O durante 10 min. A continuación se deshidrataron en una serie de etanol de graduación creciente, se aclararon con xilol y se montaron con un medio de montaje (como ha sido descrito previamente en el apartado anterior). Por último, los resultados de la inmunohistoquímica se analizaron mediante observación usando microscopía óptica.

#### 9.2.2.- Procedimiento de inmunofluorescencia

La tinción de inmunofluorescencia se realizó sobre las muestras histológicas del tejido con la finalidad de estudiar la presencia de varios antígenos dentro de la misma célula.

Para proceder a realizar la inmunohistoquímica, las preparaciones se desparafinaron y rehidrataron por inmersiones secuenciales en xilol (3 cambios de 15 minutos), etanol (alcohol 100%: 3 cambios de 10 minutos; alcohol 96%: 5 minutos y alcohol 70%: 5 minutos) y agua destilada durante 10 minutos. A continuación se realizó un desenmascaramiento antigénico mediante la digestión proteolítica con enzimas y calor (Solución de desenmascaramiento antigénico) se compensó la pérdida de antigenicidad que ocasiona el fijador formol. Las preparaciones se bloquearon con suero goat durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario KI-67 en solución de bloqueo durante 24 h a 4°C. Tras volver a lavar las secciones (3x5 min) con PBS-Tritón 0,1%, se realizó la incubación con el anticuerpo secundario Rhodamina Anti-Rabbit (tabla 1) diluido en la solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras la incubación las muestras se lavaron 3 veces durante 5 minutos cada una con PBS-tritón. Posteriormente, se incubaron con los anticuerpos primarios específicos (Nestina, Doblecortina y PGFA) (tabla 1) overnight a 4°C. Estos anticuerpos primarios se diluyeron en solución de bloqueo. Tras volver a lavar las secciones (3x5 min) con PBS-Tritón 0,1%, se realizó la incubación con el

anticuerpo secundario Cyanina Anti-Mouse (tabla 1) diluido en la solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras la incubación las muestras se lavaron 3 veces durante 5 minutos cada una con PBS-tritón. Posteriormente, los núcleos celulares se tiñeron con DAPI. El exceso de DAPI se lavó nuevamente 3 veces durante 5 minutos con PBS-tritón. Por último, se montaron las muestras con portaobjetos sellándose con Mowiol como medio de preservación de la fluorescencia.

### 9.3.- Estudio de la muerte celular: Apostain.

Al objeto de estudiar la muerte y degeneración celular, se llevó a cabo la técnica apostain.

#### ➤ Material

- Cubetas histológicas
- Xilol (Merck kGaA, Alemania)
- Alcohol (100º, 96º, 70º) (Panreac, Barcelona, España)
- H<sub>2</sub>O destilada (Serrasol laboratorios España)
- Hematoxilina (Analema España)
- Guantes (Kendall, Massachusetts, USA)
- Peróxido de hidrógeno al 30% (Sigma- Aldrich, Madrid, España)
- Metanol (Panreac, Barcelona, España)
- Buffer fosfato salino (Lonza Verviers Sprl, Bruselas, Bélgica)
- 3, 3' diaminobencidina (Sigma- Aldrich, Madrid, España)
- Vectastain ABC reagent. (Vector laboratorios Burlingame CA)
- Cubreobjetos (Menzel-Glaser Braunschweig, Barcelona, España)
- Medio de montaje soluble en Xilol (Sigma Aldrich, España)
- Anticuerpo primario anti-ssADN, F7-26 (Alexis Biochemicals Corporación, USA)
- Anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa Anti-mouse Zymed (Invitrogen, live technology scotland UK)

#### ➤ Equipos

- Microscopio ((Optimas 6.2, Bothell, WA,USA))

#### ➤ Soluciones

Solución de Saponina (0,1 mg/ml):

- 10 mg de Saponina
- 100 ml de PBS

#### Solución de Proteinasa K (20 µg/ml)

- 2 mg de Proteinasa K
- 100 ml de PBS

#### Solución de Formamida al 50%

- 50 ml de Formamida desionizada
- 50 ml de H<sub>2</sub>O

#### Solución de inactivación de la peroxidasa endógena (10 ml):

- 1ml metanol
- 1ml PBS 10x
- 7 ml H<sub>2</sub>O
- 1ml peróxido de hidrógeno al 30%

#### Solución de bloqueo (100 ml)

- 3 gr de leche desnatada en polvo
- 100 ml de H<sub>2</sub>O

#### ➤ Procedimiento

Los tejidos fueron desparafinados en xilol (3 veces durante 10 minutos) y rehidratados mediante un gradiente de alcoholes (100°, 3 veces durante 10 minutos; 96 durante 5 minutos; 70° durante 5 minutos y H<sub>2</sub>O durante 10 minutos). Los cortes se incubaron en solución de saponina durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar los cortes con tres baños de PBS, estos se transfirieron a una solución de proteinasa K a temperatura ambiente durante 20 minutos, con la finalidad de degradar las proteínas nucleares y aumentar de esta forma la accesibilidad del ADN. A continuación se realizó un desenmascaramiento antigénico mediante la incubación con una solución de formamida a 75°C durante 20 minutos. De forma inmediata se transfirieron los cortes a una cubeta de PBS a 4°C. La peroxidasa del tejido se inactivó tras la incubación de la muestra en una solución de inactivación de la peroxidasa endógena durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, los cortes se lavaron 3 veces en PBS durante 5 minutos. Las uniones no específicas de la muestra

fueron bloqueadas con solución de bloqueo durante 15 minutos. El anticuerpo primario utilizado es el anti-ssADN, F7-26 una concentración de 1:100 durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar las secciones (3x5 min) con PBS-Tritón 0,1%, se realizó la incubación con el anticuerpo secundario anti-mouse conjugado con peroxidasa diluido en la solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras la incubación las muestras se lavaron 3 veces durante 5 minutos cada una con PBS-tritón. El cromógeno que se aplicó fue 3' diaminobencidina. La reacción se controló al microscopio y se detuvo, mediante 2 lavados de 10 min de H<sub>2</sub>O, cuando se alcanzó la tinción óptima de elementos positivos respecto a la tinción inespecífica de fondo. El exceso de DAB se limpió con agua destilada durante 10 min. Posteriormente, las muestras se contrastaron con Hematoxilina durante 5 minutos y se lavaron en H<sub>2</sub>O durante 10 minutos. A continuación se deshidrataron en una serie de etanol de graduación creciente, se aclararon con xilol y se montaron con un medio de montaje (como ha sido descrito previamente en el apartado anterior). Los resultados de la inmunohistoquímica se analizaron mediante observación usando microscopía óptica.

#### 9.4.- Análisis cuantitativo de la proliferación y de la muerte celular.

Con objeto de mantener un criterio constante a la hora de realizar las comparaciones entre el grupo experimental y el grupo control, se definieron 10 niveles de análisis a lo largo del eje rostrocaudal. La elección de estos niveles, se realizó de tal modo que, en conjunto, constituyeran una completa representación de la anatomía de la lesión de los ganglios basales. En el momento del seccionamiento, el primer corte recogido fue el correspondiente a la primera sección rostral en la que se distingue por primera vez la lesión, nivel en el que empiezan a aparecer los ventrículos laterales. A partir de este nivel se seleccionó uno de cada 10 cortes de la serie hasta alcanzar el que fuera el nivel 10, donde termina la lesión y comienza a verse el hipocampo.

Para analizar la distribución de las células de nueva generación en la zona subventricular bajo las distintas condiciones experimentales, se llevó a cabo el recuento de las células positivas a KI-67, en cada uno de los niveles descritos anteriormente, utilizando el microscopio óptico. Para ello, se analizó la distribución de los elementos positivos en dos áreas: la zona subventricular y el interior de la lesión. Además, con el fin de investigar las posibles diferencias en la maduración y la identidad de las células en proliferación, que representan la gran mayoría de las células de nueva generación, a la hora del recuento, se diferenciaron distintos tipos celulares en base a los comarcajes de fluorescencia, tal como los describen en el apartado anterior.

### 9.5.- Hibridación in situ: marcaje del gel SRY del cromosoma Y

Con el objetivo de localizar las CMMA inyectadas en el parénquima cerebral se utilizaron células procedentes de donantes macho y se trasplantaron en ratas receptoras hembra. Posteriormente se realizó la técnica de la hibridación in situ con una secuencia específica contra el gen murino Sry, que se encuentra en una región que codifica proteínas encargadas de los caracteres secundarios sexuales masculinos dentro del cromosoma Y identificando así las CMMA trasplantadas.

#### ➤ Materiales

- Xilol (Merck kGaA, Germany)
- Alcohol (100°, 96°, 70°) (Panreac química Sau, Barcelona, España)
- Glicina (Invitrogen, live technology scotland UK)
- Paraformaldehído (Merck kGaA Germany)
- Formamida (Sigma Aldrich, España)
- Denhardt's (Biochemik Fluka)
- Tiocianato Sódico (Sigma Aldrich, España)
- SSC 20x (Biorad laboratorios Hércules CA)
- HCl (Merck Massachusetts, USA)
- Proteínasa K (Sigma Aldrich, Madrid, España)
- Dextrán Sulfato Fluka (Sigma Aldrich Madrid, España)
- Tritón (Sigma Aldrich, Madrid, España)
- Tween 20 (Sigma Aldrich, Madrid, España)
- DEPC (Sigma Aldrich, Madrid, España)
- Anticuerpo 1<sup>ario</sup> monoclonal Anti-Biotina (1:100, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Baltimore Pike, USA).
- Anticuerpo 2<sup>ario</sup> Anti-mouse conjugado con biotina (5 µg/ml, Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA, USA)

#### ➤ Soluciones

##### Solución de prehibridación

- 2,5 ml de formamida al 100%
- 250 µl de denhardt's
- 500 µl de SSC 20x
- 20 µl de salmon test 10 mg/ml



- 1,730 µl H<sub>2</sub>O

#### Solución de hibridación

- 84 µl solución de prehibridación
- 24 µl dextrán Sulfato al 50%
- 12 µl sonda (2,6 µl por porta 400 ngr)

#### Tiocianato sódico:

- 0,8gr de tiocianato sódico
- 10 ml H<sub>2</sub>O

#### Solución de proteinasa K

- 0,22 ml HCl
- 25µl proteinasa K
- 1 µl tritón
- 9754 ml PBS.

#### Detergente tween

- 0,01 ml de tween 20 al 10%
- 20 ml de SSC 4x.

#### Glicina

- 0,02 gr de glicina
- 10 ml de PBS.

#### ➤ Procedimiento

Secciones procedentes del área de trasplante, se desparafinaron y deshidrataron con xilol y una serie gradual de alcoholes (como se describe previamente en los apartados anteriores). Se evitaron los enlaces no específicos de la sonda con grupos amino cargados positivamente por acetilación de estos residuos con una incubación de tiocianato sódico a 80°C durante 10 minutos. Posteriormente, las muestras se digirieron con solución de proteinasa K (30 µg /ml) durante 15 minutos a 37°C con la finalidad de degradar las proteínas nucleares y aumentar de esta forma la accesibilidad del ADN. La proteinasa K fue inactivada con glicina durante 2 minutos. El exceso de glicina fue eliminado mediante 3 lavados con PBS de 5 minutos. Acto seguido, se fijaron

las muestras con paraformaldehído durante 2 minutos seguido de 3 lavados de PBS durante 5 minutos. Para evitar detección inespecífica del gen SRY del cromosoma Y la membrana se bloquearon las muestras en una solución de prehibridación durante 5 h a temperatura ambiente. La hibridación se realizó incubando la muestra a 50°C toda la noche con una mezcla de hibridación que contiene la sonda de sADN. La sonda utilizada para la detección de la expresión del gen SRY del cromosoma Y fue sintetizada químicamente y biotinizada en los extremos. Transcurrido el proceso de hibridación, el exceso de la sonda se eliminó mediante tres lavados con formamida al 50% durante 15 minutos a 50°C. El exceso de formamida se limpió mediante 3 lavados de SSC 2x de 5 minutos cada uno a 50°C. Para eliminar los elementos de la membrana lipídica y así favorecer la accesibilidad de los anticuerpos a la sonda, las muestras fueron incubadas con Tween 20 durante 10 minutos a 50°C. La señal de la sonda fue visualizada gracias a inmunohistoquímica convencional usando un anticuerpo primario monoclonal anti-Biotina. Transcurrido ese tiempo, las preparaciones se sometieron a tres lavados (3x15 min) y fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti-mouse conjugado con biotina e incubando con el complejo avidina-biotina ligado a peroxidada y con DAB, tal y como se explica en el apartado anterior. Posteriormente, las muestras se contrastaron con Hematoxilina durante 5 minutos y se lavaron en H<sub>2</sub>O durante 10 minutos. Por último, se deshidrataron en una serie de etanol de graduación creciente, se aclararon con xilol y se montaron con un medio de montaje (como se describe en el apartado anterior). Los resultados de la inmunohistoquímica se realizaron mediante observación usando microscopía óptica.

#### 9.6.- Estudio de la diferenciación neural de CMMA trasplantadas.

##### ➤ Material

- Anticuerpo 1<sup>ario</sup> anti-mouse IgG conjugado con rodamina (Jackson ImmunoResearch)
- Anticuerpo 1<sup>ario</sup> mouse anti- NeuN IgG 1:500 (Chemicon international)
- Anticuerpo 1<sup>ario</sup> mouse anti-PGFA IgG 1µl/ml (Lab Vision Corporation)
- Anticuerpo 2<sup>ario</sup> anti-mouse conjugado con cyanina 1:200 (Jackson ImmunoResearch)
- DAPI (Cambrex Bio Science, USA)
- Medio de montaje Glicerol (Merck, Massachusetts, USA)
- Cubreobjetos (Menzel-Glaser Braunschweig, Barcelona, España)

#### ➤ Procedimiento

Para la realización de los comarcajes del gen Sry con NeuN y PGFA respectivamente, el anticuerpo secundario utilizado para marcar la sonda fue anti-mouse IgG conjugado con Rhodamina. Después de realizar los lavados con PBS se incubaron distintas muestras toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios mouse anti- NeuN IgG 1:500 y mouse anti-PGFA IgG 1µl/ml respectivamente. Al día siguiente se lavó el anticuerpo primario con PBS y se incubó 1 hora el anticuerpo secundario anti-mouse conjugado con cyanina 1:200. Tras lavar el anticuerpo secundario con PBS se incubaron los cortes con DAPI durante 1 minuto y se montaron en medio de montaje Glicerol. Los resultados se observaron bajo el microscopio de fluorescencia.

#### 9.7.- Tricrómico de Masson.

##### ➤ Material

- Ácido acético (Sigma Aldrich, Madrid, España)
- Alcohol 100° (Panreac química Sau, Barcelona, España)
- Alcohol 96° (Panreac química Sau, Barcelona, España)
- Fuchina ácida (Carlo Erba Reagent)
- Agua destilada (Serrasol laboratorios España)
- Hematoxilina de Hills (Analema España).
- Orange G (Carlo Erba Reagent)
- Verde luz (Carlo Erba Reagent)
- Xilidine de Ponceau (Carlo Erba Reagent)
- Xilol (Merck, Alemania)

##### ➤ Reactivos

##### Ácido acético al 1 %

- 1 ml de ácido acético
- 99 ml de H<sub>2</sub>O.

##### Fuchina ácida al 1%

- 1 gr de fuchina ácida
- 100 ml de ácido acético al 1%.

Xilidine de ponceau al 1%

- 1 gr de xilidine de ponceau
- 100 ml de ácido acético al 1%.

Fuchina ácida y xilidine de Ponceau 50:50

- 50 ml de fuchina ácida 1%
- 50 ml de xilidine de ponceau al 1%.

Orange G y ácido fosfomolímbico

- 2 gramos de orange G
- 1 gr de ácido fosfomolímbico
- 100 ml de H<sub>2</sub>O.

Verde luz al 1%

- 1 gr de verde luz
- 100 ml de ácido acético al 1%.

#### ➤ Procedimiento

Para el tricrómico de Masson se procedió al desparafinado y rehidratado de las piezas de la misma forma que para la técnica de Hematoxilina-Eosina.

La tinción se realizó según el método siguiente:

Se incubaron las muestras en hematoxilina de Hills durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron con H<sub>2</sub>O durante 5 minutos. Posteriormente se incubaron los cortes con la mezcla de fuchina ácida y xilidine de ponceau 50:50 durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las muestras con ácido acético al 1%. Se procedió a incubar las preparaciones con la mezcla de orange G y ácido fosfomolibico. Se lavaron las muestras con ácido acético al 1%. Se incubaron los cortes con verde luz al 1% durante 12 minutos a temperatura ambiente. Se deshidrató y se montó la muestra según la técnica de hematoxilina-eosina.

## **10.- Análisis estadísticos**

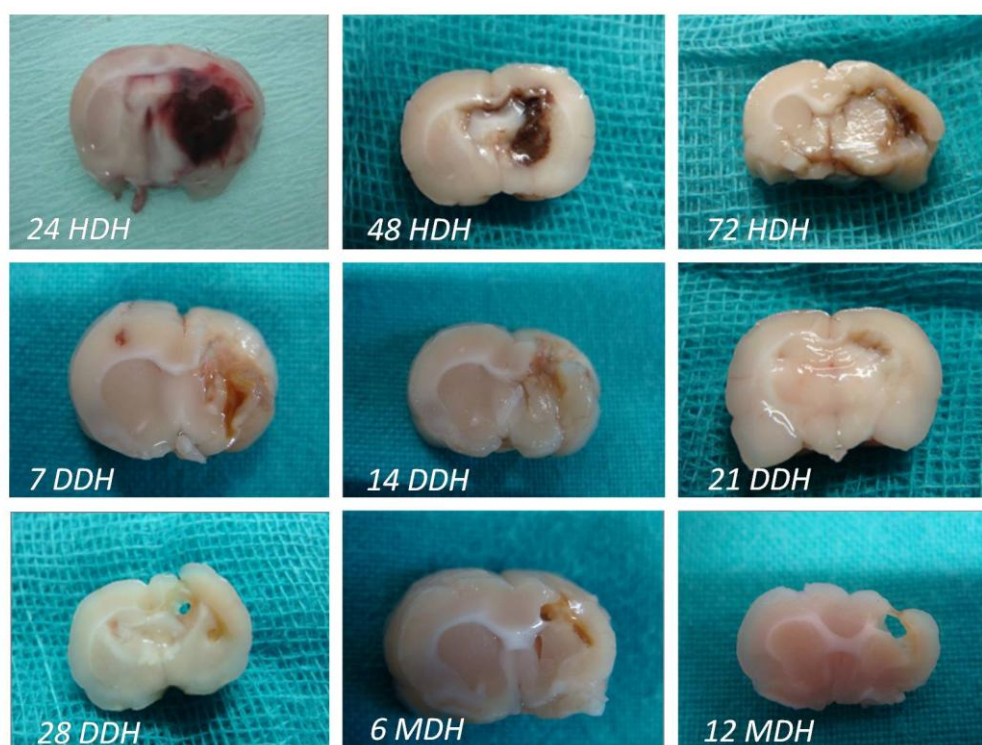
Para realizar los diferentes análisis estadísticos se utilizó el programa SPSS para Windows (version 15.0; Inc., Chicago, EE.UU.), llevando a cabo diferentes test dependiendo de las características de los datos a analizar. Previamente se analizó la normalidad de los datos mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. Si estos resultaban paramétricos se aplicó el test de la T de Student. En todos los casos el nivel mínimo de significación se fijó en el 95 %, por lo que consideramos como diferencias significativas los análisis en los que el valor de  $p < 0,05$ .

## **V. RESULTADOS**

## V. Resultados

El cuidado de los animales en este estudio ha cumplido con las normas establecidas por los principios de Cuidado de Animales de Laboratorio y la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio emitido por la Sociedad Americana para la investigación médica.

En el presente estudio la totalidad de los animales presentaron una disfunción neurológica después de la lesión hemorrágica cerebral que coincidió con la aparición de un hematoma en el área de los ganglios basales. Posteriormente la hemorragia se reabsorbió secuencialmente a lo largo de la evolución de la lesión (Figura 1).



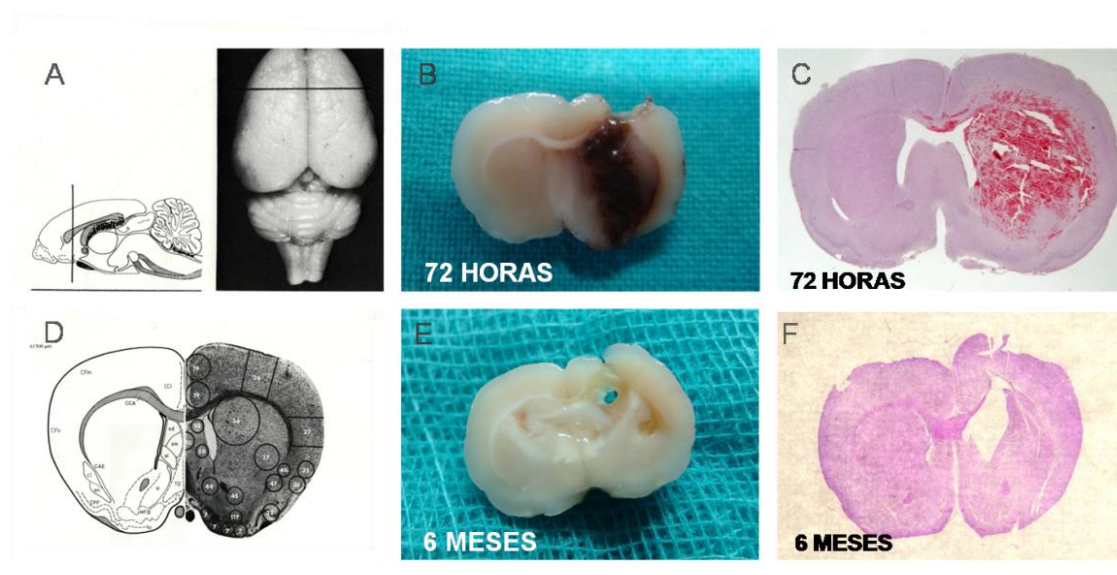
**Figura 1.** Vista macroscópica de la evolución de los hematomas y el estado de la lesión a lo largo del estudio.

## 1.-ESTUDIO FISIOPATOLÓGICO DE LA LESIÓN HEMORRÁGICA EXPERIMENTAL

### Análisis anatómico del ictus hemorrágico

En todos los casos se estudiaron cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina para evaluar los cambios del tejido en los diferentes tiempos tras la lesión. El objetivo de este procedimiento fue realizar una primera tinción de los tejidos para poder estudiar las estructuras más importantes.

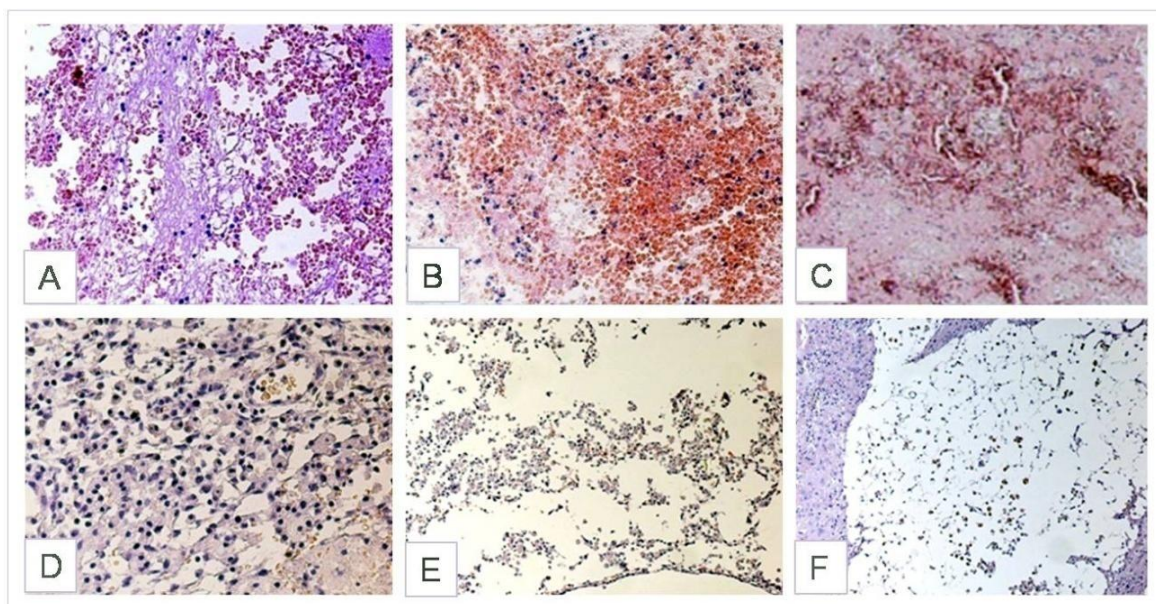
El estudio morfológico identifica la zona de lesión en todos los animales como una cavidad central cerca del ventrículo, rodeada por una pared de diferentes células.



**Figura 2.** Localización de la lesión. A) Localización del nivel medio de la lesión: coordenadas esterotáxicas rostrocaudal -0.04 mm, lateromedial 3,5 mm y dorsoventral 6 mm .B) Aspecto macroscópico de la lesión en un corte coronal de la fase aguda de un ictus hemorrágico. C) Hematoxilina-Eosina de un corte coronal del nivel medio de la lesión a las 72 horas. D) Diagrama coronal de la anatomía cerebral del nivel de la lesión. E) Aspecto macroscópico de la lesión en un corte coronal en fase crónica a los 6 meses de evolución. F) Hematoxilina-Eosina de un corte coronal del nivel medio de la lesión a los 6 meses.

En la fase aguda, la lesión se caracteriza por la presencia del hematoma y por la acumulación de células inflamatorias y mediadores en el cerebro (Figura 3): fagocitos periféricos, linfocitos T, células natural killer (NK) y leucocitos polimorfonucleares secretan citocinas y pueden contribuir a la inflamación en el cerebro tras la hemorragia cerebral. Este hematoma y las estirpes celulares se reabsorben progresivamente hasta los 28 días posteriores a la lesión, momento en el cual la zona lesionada se encuentra vacía a excepción de la presencia de macrófagos.





**Figura 3:** Hematoxilina-Eosina. Vista microscópica de la evolución de los hematomas y el estado de la lesión a lo largo del estudio: 24, 48, 72 horas, 7, 14, 28 días de evolución de la lesión (A, B, C, D, E y F respectivamente).

### Caracterización celular de la zona subventricular

El desarrollo de técnicas de inmunohistoquímica ha permitido la identificación, sobre muestras tisulares o citológicas, de determinantes antigénicos característicos de distintas líneas de diferenciación, proliferación y muerte celular.

La tinción inmunohistoquímica se ha realizado sobre las muestras histológicas del tejido. Una vez obtenidas las secciones de tejido, se llevó a cabo la detección de diferentes antígenos. Los resultados de la inmunohistoquímica se han analizado mediante observación usando microscopía óptica.

Al objeto de estudiar la capacidad de las CMMA trasplantadas de activar la neurogénesis endógena del cerebro lesionado se realizaron distintos estudios histológicos con los anticuerpos Nestina, Doblecortina y PGFA. Los resultados de este estudio corroboraron que la ZSV está formada por distintos tipos celulares:

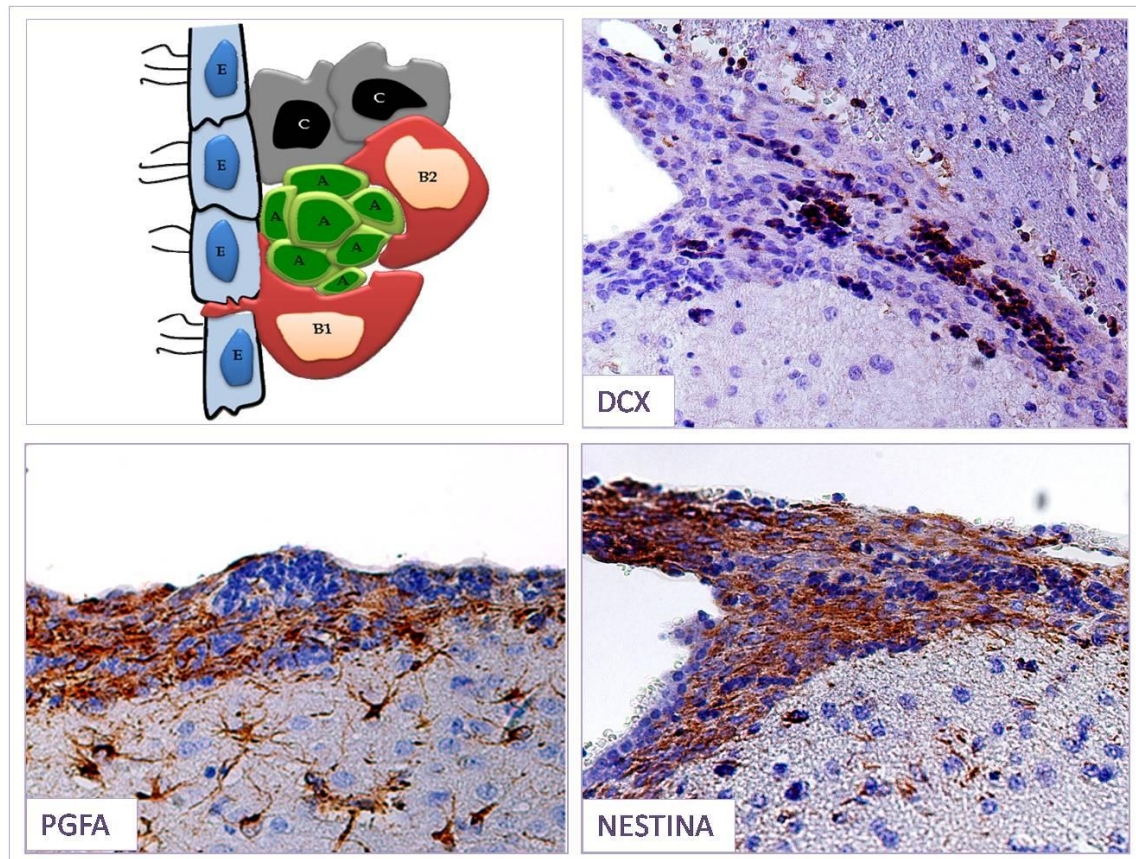
Las células tipo A, son Neuroblastos. Estos poseen una morfología bipolar, con un cuerpo celular alargado y de contorno liso. Ultraestructuralmente poseen un núcleo de gran tamaño, eucromático y ocasionalmente invaginado. (Doetsch et al., 1997). El marcador empleado para su detección fue Doblecortina (DCX).

Las células tipo B o de clase II son consideradas astrocitos. Tienen un contorno irregular, al igual que su núcleo, que presenta numerosas indentaciones. Se han descrito dos subtipos de células B atendiendo a su posición y a su apariencia ultraestructural, las de tipo B1 y las de tipo B2. Las células B2 son mas electrodensas, mas pequeñas y con núcleos mas heterocromáticos que las de tipo B1. Por otra parte, las células de tipo B1 se localizan mayoritariamente en la zona adyacente a la monocapa endimaria donde extienden sus procesos formando una lamina que recubre la capa endimial, mientras que las células de tipo B2 se localizan en el límite con el parénquima del estriado (Doetsch et al., 1997; Peretto et al., 1997). Las células de tipo B1, al igual que la glia radial durante el desarrollo temprano, tienen su superficie apical en contacto con la luz del ventrículo, del que surge un único cilio corto que llega hasta la cavidad ventricular. Este contacto entre las células B1 y el liquido cefalorraquídeo puede ser determinante en la regulación de:

- los procesos de división simétrica y asimétrica de estas células
- la exposición a moléculas como noggin producida por los endimocitos y que es esencial para el mantenimiento del nicho neurogénico (Chenn and Walsh, 2002; Kosodo et al., 2004; Lim et al., 2000; Mirzadeh et al., 2008). Estas células presentan como marcadores neuroquímicos característicos, entre otros, la proteína acida fibrilar glial (PGFA)

El tercer tipo celular son las células tipo C, que son los precursores neurales con una alta tasa proliferativa, y son, por ello, las más activas mitóticamente, mostrando una tasa proliferativa diez veces superior a las de tipo A o B (Doetsch et al., 1997). Se ha postulado que estas células son las progenitoras de las células de tipo A. Estas células no migran y se acumulan formando grupos. Se cree que son una población intermedia que se divide rápidamente para dar lugar a numerosos Neuroblastos que inician después la migración (Garcia-Verdugo et al., 1998). Se marcan con Nestina.

Existen también otros tipos celulares como las células endimales o células E que forman una monocapa multiciliada que establece el límite con la cavidad ventricular (No marcadas).



**Figura 4.** Representación esquemática de la organización de la ZSV. En una sección transversal los progenitores neuronales (verde) dan lugar a agrupaciones de células rodeadas por las células de tipo B (rojo). Las células de tipo C (gris) se organizan en pequeñas agrupaciones asociadas a los clusters de Neuroblastos. Las células ependimales (azul) forman una monocapa que separa el resto de células de la luz del ventrículo. A, Neuroblasto. B1 y B2, subtipos celulares de astrocitos. C, célula precursora. E, ependimocito (Modificado(Doetsch et al., 1997)). Tinción de la ZSV con los anticuerpos DCX marcando las células A, PFGA marcando las células B y Nestina marcando las células C.

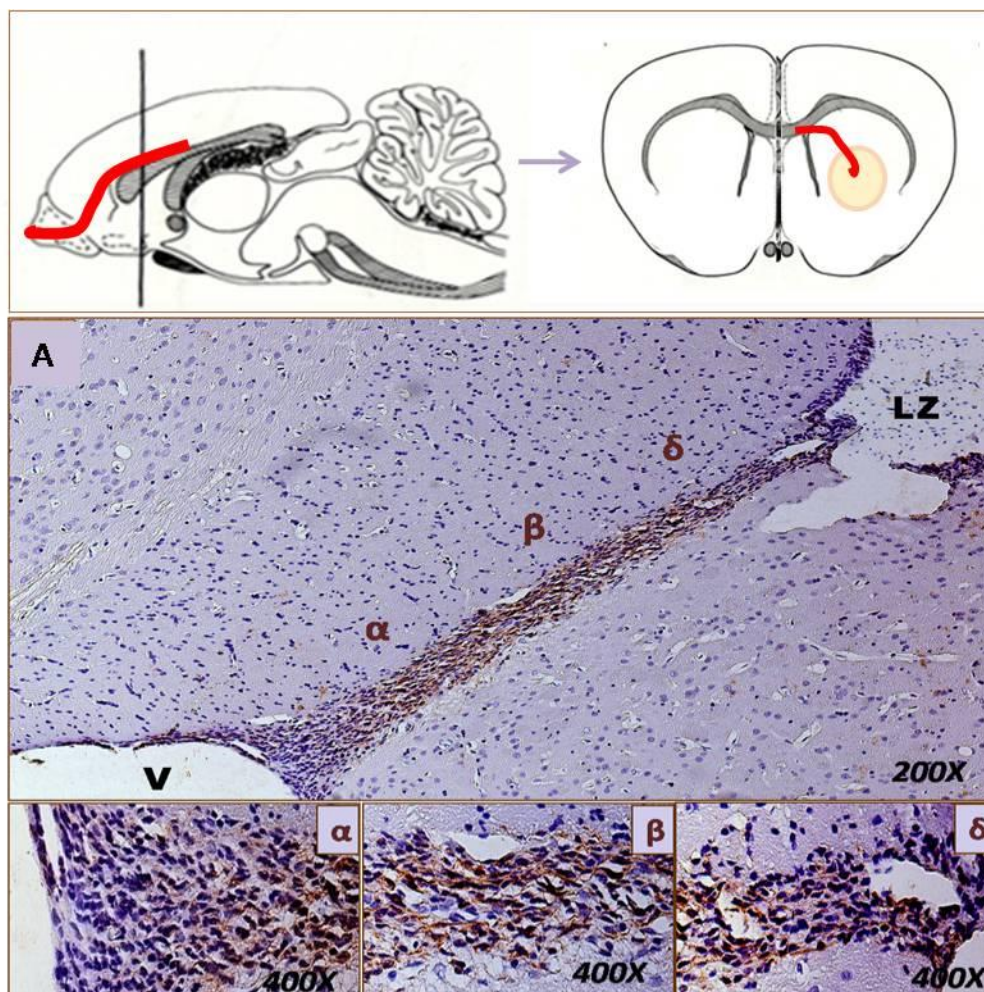
#### **Migración de los neuroblastos neoformados. Desviación de la ruta de migración rostral.**

Una de las características de las células originadas en los procesos neurogénicos que tienen lugar en el SNC es su habilidad para migrar desde los lugares de origen, en las zonas germinales, hasta sus posiciones finales.

La migración de los Neuroblastos hacia el bulbo olfatorio transcurre a través de una ruta restringida de migración conocida como CMR (Kornack and Rakic, 2001; Lois and Alvarez-Buylla, 1994). Las cadenas formadas por los Neuroblastos están rodeadas por una malla constituida por procesos de astrocitos que derivan directamente de la glia radial embrionaria (Doetsch et al., 1997; Merkle et al., 2004).



Como resultados de este trabajo, en los grupos de animales trasplantados con CMMA se observó la desviación de la ruta CMR por parte de las células neoformadas. Los Neuroblastos procedentes de la zona subventricular del cerebro migraron hacia la zona de lesión, con la finalidad de reemplazar las neuronas perdidas en consecuencia a la muerte celular tras la lesión.



**Figura 5:** Representa la desviación de los Neuroblastos desde la CRM hacia la lesión (A). Se observa como los Neuroblastos migran desde la zona subventricular hacia la lesión (B ).

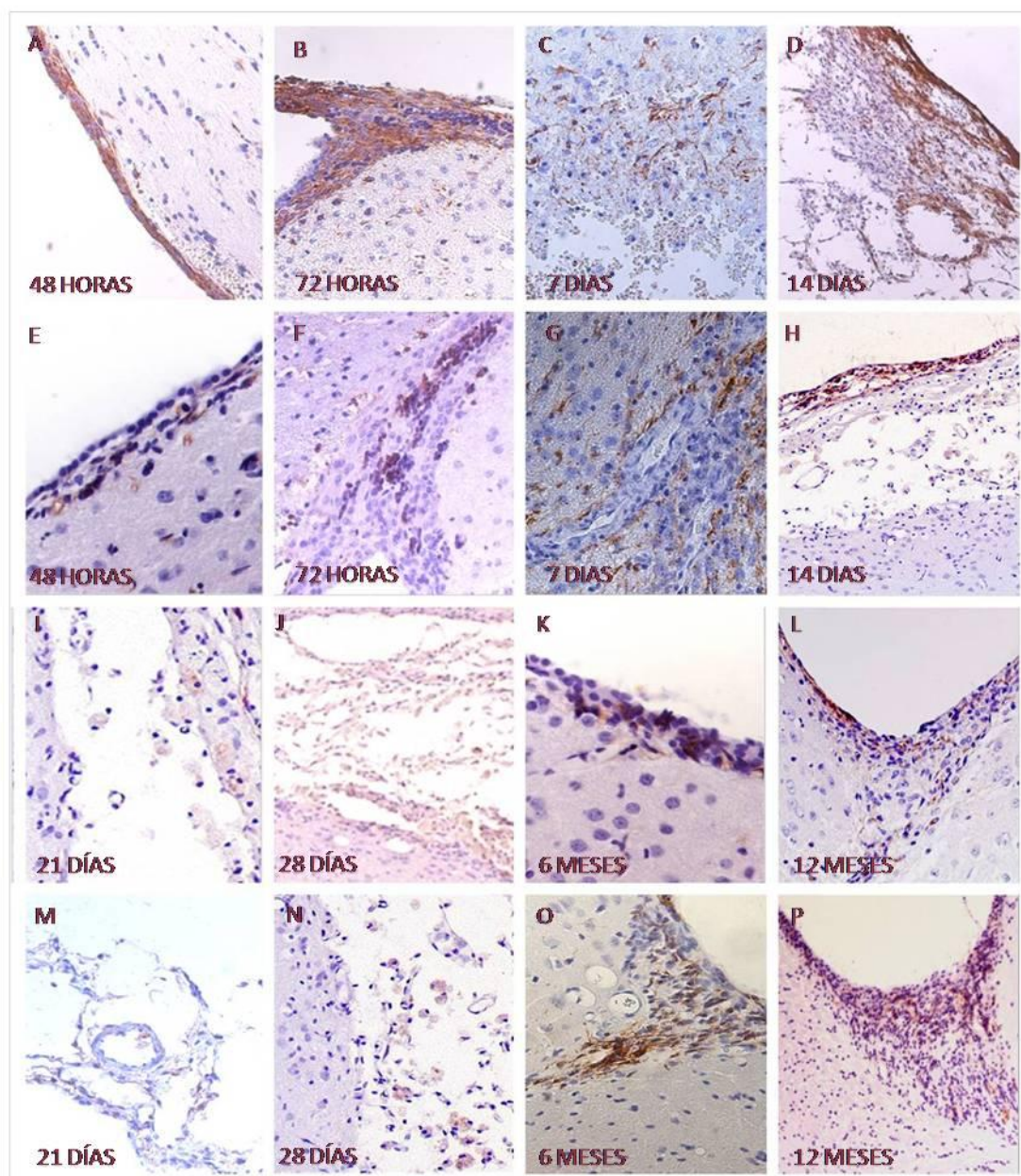
### **Caracterización fisiopatológica del ictus hemorrágico experimental**

En primer lugar se desarrollaron distintos estudios histológicos de la hemorragia cerebral al objeto de conocer las características fisiopatológicas de la lesión en fase aguda y establecer cuál es el momento óptimo para el trasplante de CMMA. Estos estudios se realizaron a distintos tiempos de evolución de la lesión: 24, 48 y 72 horas, 7, 14, 21, 28 días, 6 y 12 meses.

En primer lugar se evaluó la distribución de las proteínas Doblecortina, Nestina y PGFA en los distintos tiempos de evolución de la HIC. En segundo lugar se comparó la actividad proliferativa de las células potenciada por mediadores químicos procedentes de la lesión cerebral. Terceramente se estudió la distribución y la identidad de las células que sufren procesos de muerte celular por apoptosis como consecuencia de la lesión intracerebral. Finalmente, se estudió la fisiopatología característica de cada momento evolutivo de la HIC.

#### **Distribución de la expresión de las proteínas Doblecortina y Nestina posterior a la lesión.**

A las 24 horas de evolución de la lesión, la expresión mayoritaria de proteínas fue PGFA en las células de la ZSV. En las 48 horas posteriores a la lesión se produjo un incremento en la expresión de la Nestina en la zona subventricular del cerebro. Pasadas 72 horas de la lesión cerebral se incrementó además la expresión de Doblecortina en la zona neurogénica. Así mismo, en la zona de lesión (ZL) comenzaron a aparecer células cuya expresión de las proteínas Nestina y Doblecortina estaba potenciada. A los 7 días de evolución del daño cerebral, una alta presencia de Neuroblastos y de células Nestina positivas colonizaba la lesión y la zona neurogénica. Si bien los niveles de expresión de Nestina comienzan a disminuir en el estriado lesionado pasados 14 días de la hemorragia intracerebral, la Doblecortina en este momento de evolución de la lesión permanece constante. Sin embargo la expresión de estas dos proteínas se localiza casi exclusivamente en la ZSV a partir del día 28 posterior a la lesión ya que la lesión en este punto de evolución se encuentra parcialmente vacía como se muestra en la figura 6 (Figura 6).



**Figura 6.** Identificación fenotípica de las proteínas Nestina: A) 48 horas en la ZSV B) ZSV a las 72 horas C) ZL a los 7 días D) ZL a los 14 días I) ZL a los 21 días J) ZL a los 28 días K) 6 meses en la ZSV L) 12 meses de evolución de la lesión en la ZSV y de Doblecortina E) 48 horas en la ZSV F) 72 horas en la ZSV G) en la ZL a los 7 días H) 14 días en la LZ M) en la ZL 21 días N) ZL a los 28 días O) 6 meses en la ZSV P) 12 meses en la ZSV.

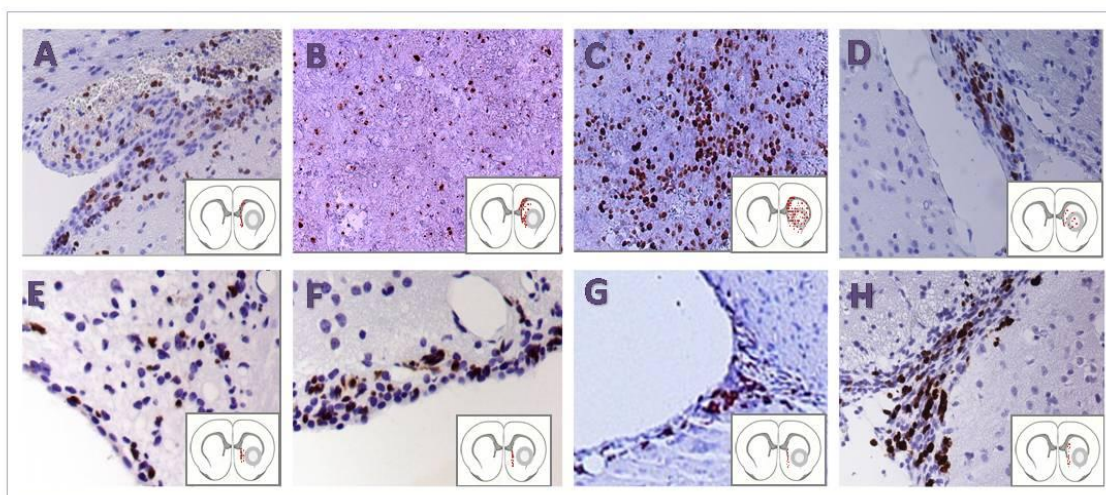


### Cuantificación de células mitóticas tras la lesión

La proteína Ki-67 está presente en todas las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2 y mitosis), pero está ausente de las células en reposo (G0), por lo tanto, es un marcador de proliferación celular.

Para analizar la distribución de las células de nueva generación se llevó a cabo el recuento de las células positivas al antígeno KI-67, en cada uno de los niveles descritos anteriormente, utilizando el microscopio óptico. Para ello, se analizó la distribución de los elementos positivos en dos áreas: la zona subventricular y el interior de la lesión.

Los resultados de este procedimiento indicaron una estimulación de la actividad mitótica neurogénica aproximadamente 5 veces mayor ( $85 \pm 9$ ) que la actividad mitótica de un cerebro sano ( $20 \pm 3$ ). A las 72 horas del procedimiento quirúrgico se observó un aumento de la capacidad mitótica de las células pertenecientes tanto al área subventricular, como a la zona de lesión y al parénquima cerebral ( $212 \pm 22$ ). El punto de máxima proliferación se estableció 7 días tras el ictus hemorrágico ( $298 \pm 32$ ). Estas células KI-67 positivas fueron más abundantes en una situación medial que lateralmente y se muestra un gradiente decreciente rostrocaudal. A los 14 días de la lesión la proliferación celular sufrió un decremento importante tanto en la ZSV ( $150 \pm 21$ ) como en la ZL ( $108 \pm 7$ ). El número de células mitóticas disminuyó a partir del día 21 después de la lesión cerebral tanto en ZSV ( $110 \pm 11$ ) como en el estriado lesionado ( $70 \pm 13$ ) (Figura 7).



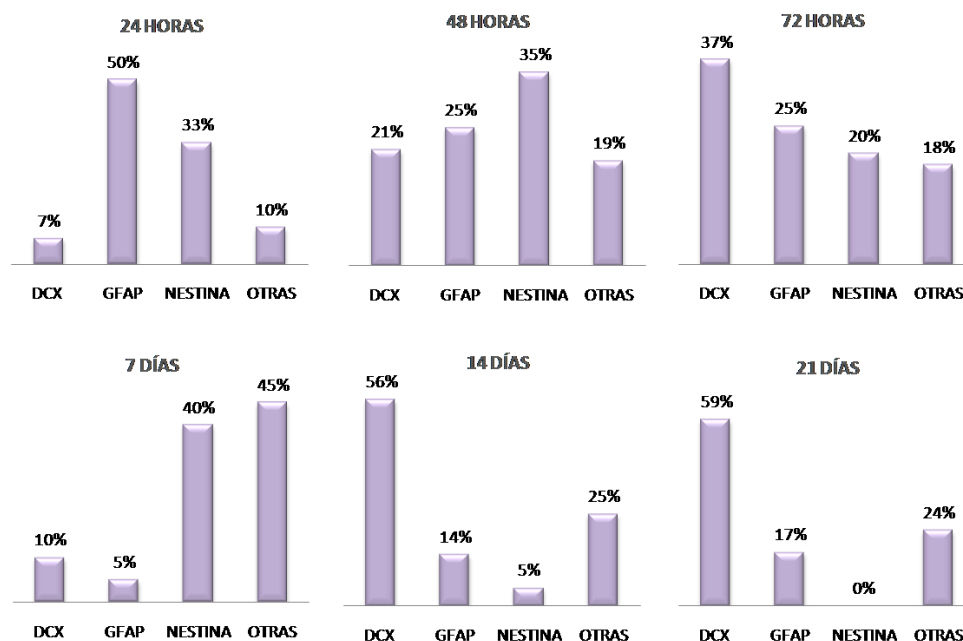
**Figura 7.** Identificación de células mitóticas: A) a las 48 horas en la ZSV B) ZL a las 72 horas C) ZL a los 7 días D) ZL a los 14 días E) ZSV a los 21 días F) ZSV a los 28 días G) 6 meses en la ZSV H) 12 meses de evolución de la lesión en la ZSV.

### **Caracterización fenotípica de las células mitóticas.**

Con el fin de investigar las posibles diferencias en la maduración y la identidad de las células en proliferación, que representan la gran mayoría de las células de nueva generación, a la hora del recuento, se diferenciaron distintos tipos celulares en base a los comarques de fluorescencia de KI-67 con Doblecortina, Nestina y PGFA. Durante los tres primeros días posteriores a la cirugía hemorrágica la mayor parte de la proliferación celular se establece en la zona neurogénica del ventrículo. Los resultados de este estudio manifestaron que la mayoría de estas células expresaron a su vez en antígeno PGFA. La expresión de Doblecortina se vio incrementada desde las primeras 24 horas (7,40%) hasta las 72 horas tras la lesión (37,03%). Sin embargo, en el seguimiento de la expresión de la Nestina ocurrió lo contrario, la cantidad de células Nestina positivas en proliferación fue disminuyendo desde el primer día (35,26%) tras la lesión hasta el tercero (20,57%). La cuantificación de estos resultados se describe con detalle en la tabla 2 y se representan en la gráfica 1.

A partir del día 7 de evolución del trasplante la mayor parte de las células mitóticas se encuentran en el interior de la lesión. Al séptimo día la lesión apareció rellena de células mitóticas expresando los anticuerpos de Nestina y Doblecortina, mientras que la señal de PGFA se detectó principalmente en los alrededores de la lesión. Pasadas dos semanas de la intervención quirúrgica en la zona de lesión se comprobó un importante descenso en la cantidad de células Nestina-positivas. Sin embargo, la cantidad de Neuroblastos se vio aumentada considerablemente. 21 días después de HIC, si bien la mayoría de las células de la lesión se vio disminuida, la mayoría de las células supervivientes adquirieron un fenotipo de Neuroblasto. La distribución de las células PGFA positivas fue homogénea en el entorno de la lesión a lo largo de las últimas tres semanas. La cuantificación de estos resultados (Tabla 2 y Figura 1) se describe en detalle a continuación.





**Gráfica 1:** Representación de la identificación fenotípica de las células mitóticas tras una hemorragia intracerebral en fase aguda.

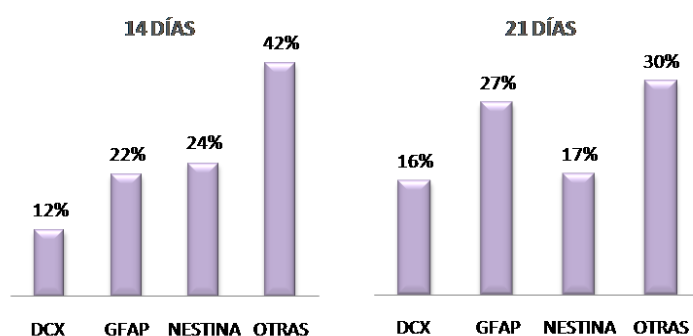
	Células KI-67 <sup>+</sup>	Células Ki67 <sup>+</sup> y DCX <sup>+</sup>	Células Ki67 <sup>+</sup> y PGFA <sup>+</sup>	Células Ki67 <sup>+</sup> y N <sup>+</sup>	Células no neurogénicas
24 horas	30	7%	50%	33%	7%
48 horas	85±9	21%	25%	35%	21%
72 días	212±22	37%	25%	20%	37%
7 días	298±32	10%	5%	40%	45%
14 días	108±7	55%	13%	5%	25%
21 días	70±13	58%	17%	0,3%	24%

**Tabla 2:** Representa los porcentajes de células mitóticas que expresan los distintos anticuerpos: DCX, PGFA y Nestina en la fase aguda.

### Estudio de la muerte celular inducida por hemorragia cerebral.

Al objeto de analizar la supervivencia de las células procedentes de la neurogénesis endógena se realizó un estudio de la muerte celular por apoptosis. A las 24, 48, 72 horas y 7 días posteriores a la hemorragia los estudios fisiopatológicos muestran que la lesión cerebral no indujo un aumento detectable de la muerte celular: la proporción de células apoptóticas se mantuvo bajo y estable a lo largo de estos tiempos de evolución.

Sin embargo, a los 14 días del ictus se asoció un abrupto aumento del número de células muertas ( $215 \pm 27$ ). En este punto de evolución, los estudios han revelado que el 11 % de las células apoptóticas se corresponden con Neuroblastos migratorios, el 26% con células Nestina positivas y el 17% con células de expresión PGFA. Cuando el periodo de evolución de la lesión se prolongó a los 21 días se redujo la muerte celular por apoptosis ( $136 \pm 22$ ) El 25% de las células apoptóticas encontradas en la zona de lesión expresaron inmunorreactividad para DCX, el 26% para Nestina y el 17% para PGFA (Gráfica 2 y tabla 3). La muerte celular por apoptosis parece contribuir significativamente a la pérdida de las células generadas por neurogénesis endógena posterior a la hemorragia cerebral.



**Gráfica 2:** Representación de la identificación fenotípica de las células apoptóticas tras una hemorragia intracerebral en fase aguda.

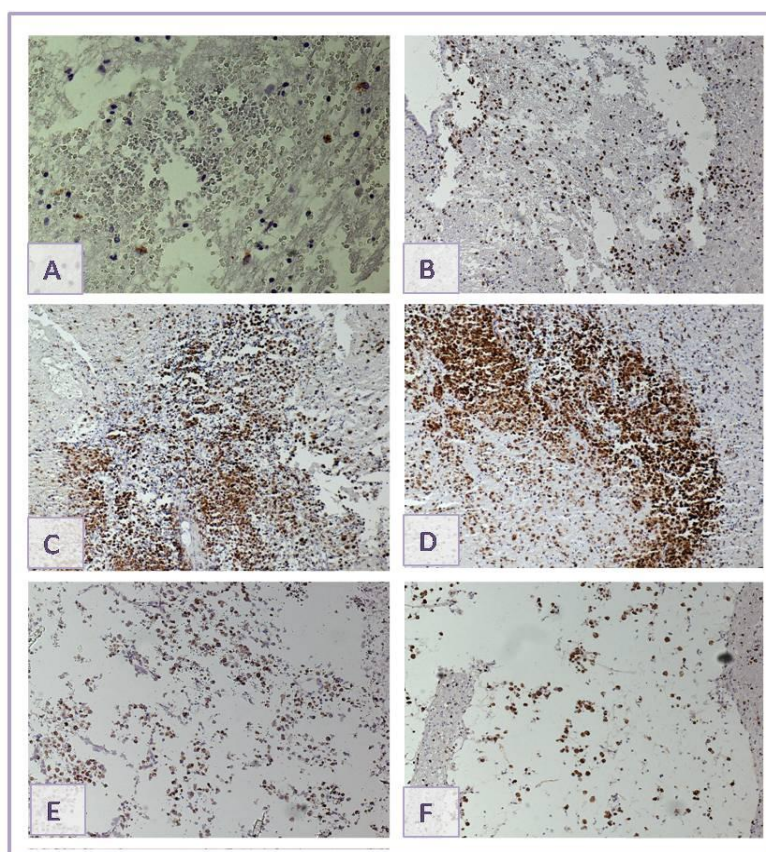
	Células F126+	Células F126 <sup>+</sup> y DCX <sup>+</sup>	Células F126 <sup>+</sup> y PGFA <sup>+</sup>	Células F126 <sup>+</sup> y N <sup>+</sup>	Otras células
14 días	215	12%	22%	24%	42%
21 días	136	16%	27%	17%	30%

**Tabla 3:** Representa los porcentajes de células apoptóticas que expresan los distintos anticuerpos: DCX, PGFA y Nestina en la fase aguda.

### Estudio fisiopatológico de la presencia de macrófagos

En su fase aguda, la lesión se caracteriza por la presencia del hematoma y por la acumulación de células inflamatorias y mediadores en el cerebro entre ellos macrófagos

derivados de la microglía. Al objeto de conocer el comportamiento de estos macrófagos se realizó una tinción de CD-68. A las 24 y 48 horas de la lesión se determinó que los macrófagos se disponen alrededor del hematoma delimitando el tejido cerebral sano y el lesionado. Sin embargo a las 72 horas posteriores a la lesión, se observa como poblaciones de macrófagos invaden la lesión, llegando a su máxima expresión a los 7 días del ictus hemorrágico. Estos macrófagos se van eliminando con la evolución de la lesión, sin embargo, a los 28 días de la hemorragia, el parénquima lesionado aún presenta este tipo celular.



**Figura 8:** Esta figura (100x) muestra la presencia de la macrófagos en la zona de lesión a las 24 horas (A), 48 horas (B), 72 horas (C), 7 días (D), 14 días (E), 28 días (F).

### **Estudio fisiopatológico de la expresión de VEGF**

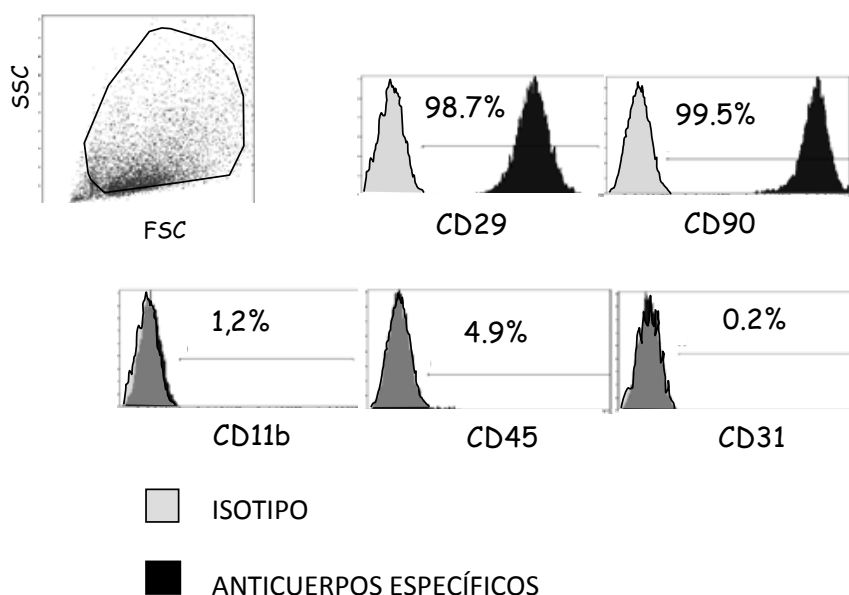
Al objeto de estudiar la expresión del factor VEGF se ha llevado a cabo una inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-VEGF. El presente estudio ha permitido demostrar que tras una hemorragia cerebral, se produce un aumento en la cantidad de células que expresan factores de angiogénesis, tales como el VEGF, mostrando su máxima expresión a los 7 días de la hemorragia y contribuyendo a la formación de un lecho vascular en el tejido huésped, y por tanto a la angiogénesis del núcleo estriado previamente lesionado para contribuir a la regeneración del tejido dañado.

## 2.- CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DEL TRASPLANTE A DISTINTOS TIEMPOS EVOLUTIVOS EN FASE AGUDA

### Caracterización fenotípica de las CMMA por citometría de flujo

Este procedimiento tiene como objetivo asegurarse que las CMMA utilizadas para el trasplante presentaron de forma homogénea una caracterización fenotípica propia de células mesenquimales antes de su infusión en el animal receptor. Así mismo, fue importante comprobar la ausencia de contaminación de células de estirpe hematopoyética entre las CMMA destinadas al trasplante. La caracterización de las células se llevó a cabo mediante citometría de flujo.

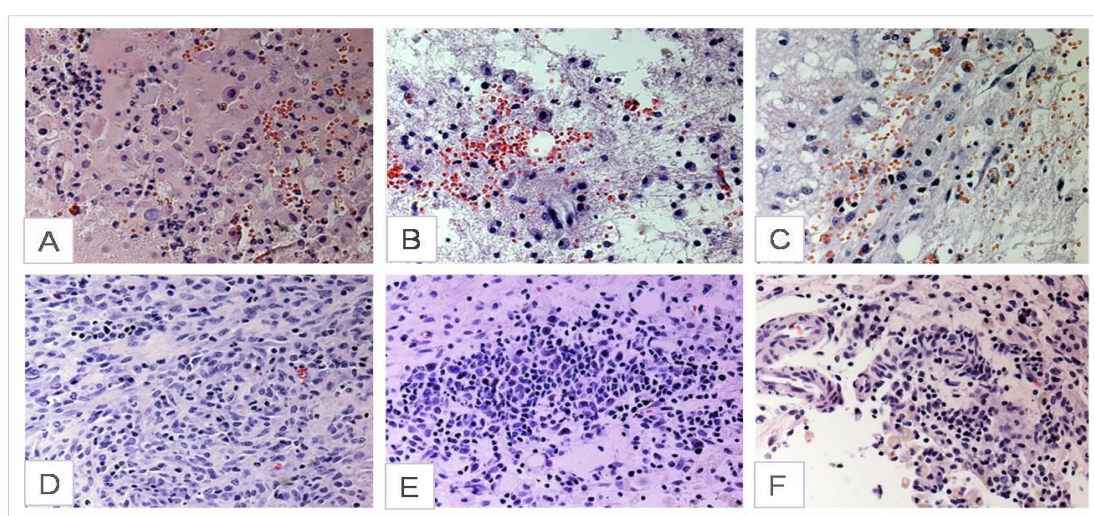
Experimentos de citometría de flujo se realizaron en un citómetro de flujo para la caracterización de CMMA.  $\geq 95\%$  de la población de CMMA expresó CD29 y CD90. Además, estas células carecían de expresión ( $\leq 5\%$  positivo) se los anticuerpos CD11b, CD45 o CD31 (Figura 9). Mediante este método se demostró una viabilidad superior al 95% de las CMMA obtenidas para trasplante de animales lesionados.



**Figure 9** Caracterización de CMMA por citometría de flujo. Las CMMA procedentes de rata fueron marcadas con anticuerpos anti-CD29, anti-CD90, anti-CD11b, anti-CD45 y anti-CD31 y posteriormente analizadas por citometría de flujo. El  $\geq 95\%$  de la población de CMMA expresaron CD29 y CD90. Además, estas células se caracterizan por la falta de expresión ( $\leq 5\%$  positivo) de CD11b, CD45 o CD31.

### Estudio anatómico del trasplante de CMMA en fase aguda

En todos los casos se estudiaron cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina para evaluar los cambios del tejido en los diferentes tiempos tras la lesión. El objetivo de este procedimiento fue realizar una primera tinción de los tejidos para poder estudiar las estructuras más importantes. No se ha observado en ningún caso crecimiento anormal del tejido producido en el cerebro trasplantado del animal. En los animales tratados se observaron las células madre administradas, desde las 24 horas hasta los 28 días, formando cúmulos entre las microhemorragias y las zonas iniciales de necrosis tisular (Figura 10).



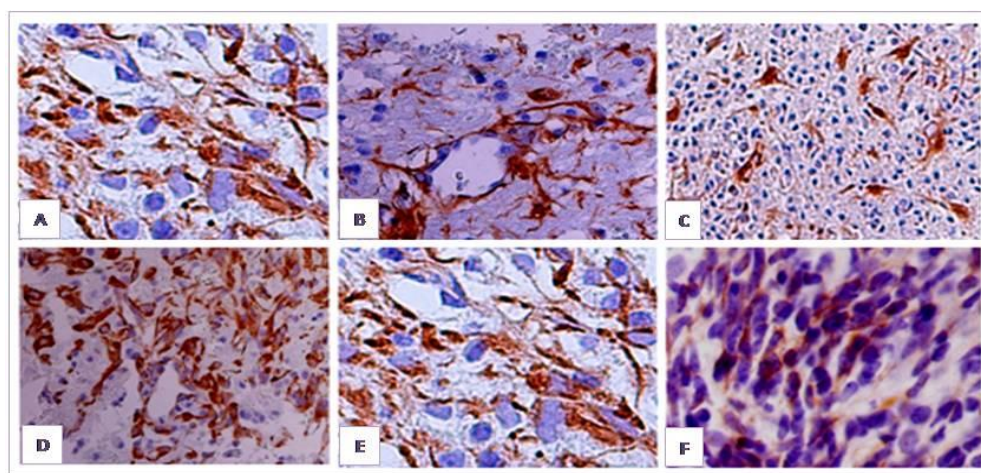
**Figura 10** Hematoxilina-Eosina. Vista microscópica de la evolución del trasplante de CMMA y el estado de la lesión a lo largo del estudio: A) 24 horas de evolución. B) 48 horas. C) 72 horas. D) 7 días. E) 14 días. F) 28 días.

### Expresión de proteínas durante la evolución del trasplante de CMMA tras una hemorragia cerebral experimental

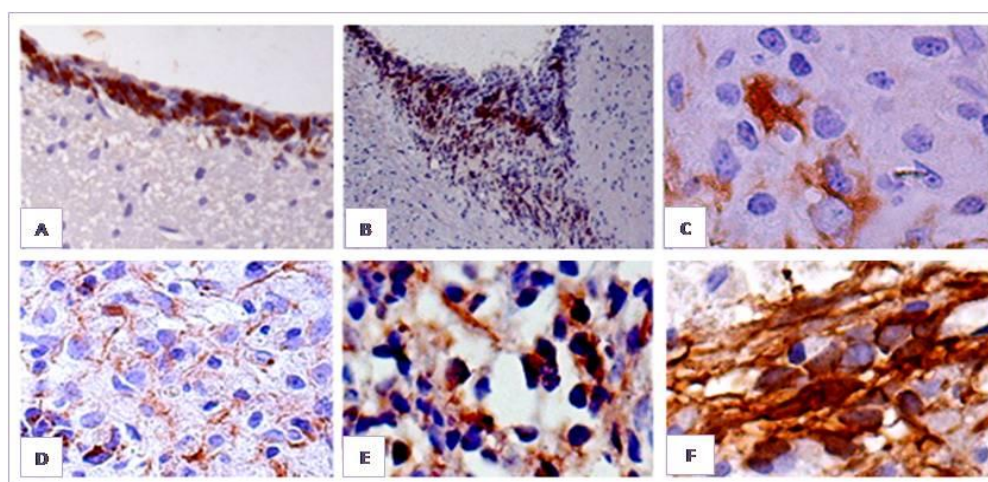
Para investigar el papel potencial de las CMMA trasplantadas tras una hemorragia cerebral se realizaron distintos estudios en determinados momentos evolutivos del trasplante al objeto de conocer las modificaciones histológicas progresivas que sufren las CMMA administradas. Los resultados de este estudio revelaron que las células trasplantadas expresan paulatinamente diversos antígenos característicos de diferenciación, tanto Nestina (Figura 11) como Doblecortina (figura 12). La función crucial de la diferenciación de estas células fue restaurar el parénquima cerebral lesionado tras el ictus sustituyendo la proporción de células muertas asociadas al daño cerebral.



Al transcurso de 48 horas de la inyección de CMMA se asoció un claro incremento en la celularidad de la zona de lesión caracterizado por un gran número de células inmunopositivas para el anticuerpo Nestina. Sin embargo el número de Neuroblastos activos se mantuvo bajo y constante en este área. 72 horas posteriores a la lesión se produjo un aumento significativo en el número de células Nestina y Doblecortina positivas. El aumento en el número de células positivas para ambos anticuerpos se mantuvo constante a los 7, 14 y 21 días. Los estudios de caracterización fenotípica de las CMMA trasplantadas demostraron que las células supervivientes al trasplante son capaces de diferenciarse a lo largo del tiempo.



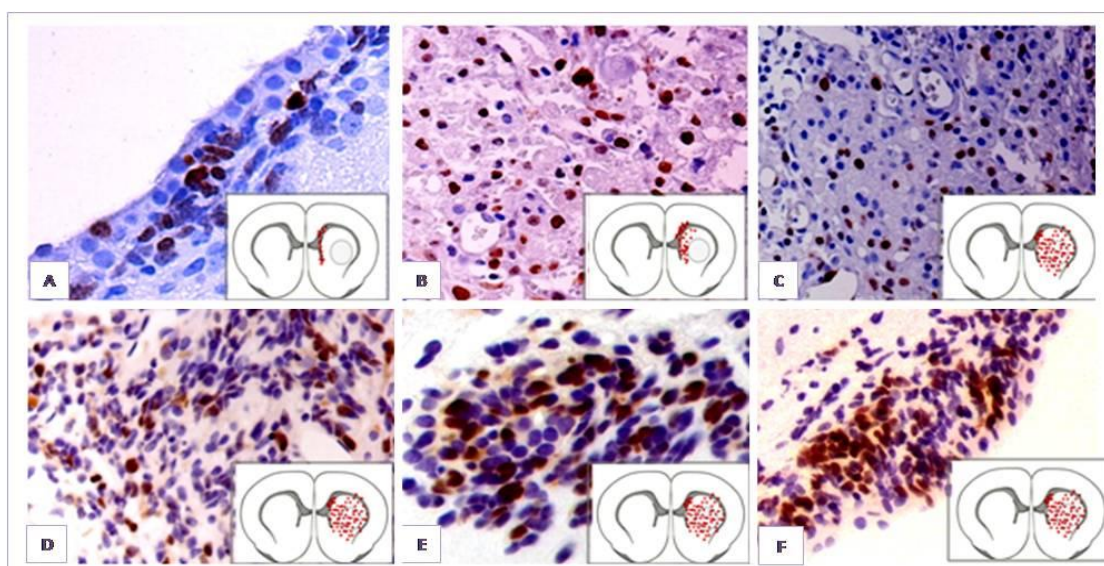
**Figura 11.** Esta figura corresponde a la zona de lesión de animales trasplantados con CMMA y demuestra la expresión fenotípica del anticuerpo Nestina en distintos momentos evolutivos del trasplante: A) 24 horas, B) 48 horas, C) 72 horas, D) 7 días, E) 14 días, F) 21 días tras el trasplante.



**Figura 12.** Esta figura corresponde a la zona de lesión de animales trasplantados con CMMA y demuestra la expresión fenotípica del anticuerpo Doblecortina en distintos momentos evolutivos del trasplante: 48 horas, 7 días, 14 días, 21 días, 1 mes y 6 meses tras el trasplante (A, B, C, D, E y F respectivamente).

### Actividad proliferativa a lo largo de la evolución del trasplante de células mesenquimales como tratamiento de un ictus hemorrágico

Al objeto de analizar la actividad proliferativa de las CMMA trasplantadas se llevó a cabo un estudio secuencial con el anticuerpo KI-67. A las 24 horas del trasplante, las células administradas no presentaron positividad para el anticuerpo KI-67. Sin embargo, a las 48 horas posteriores al trasplante, los valores de las células en división aumentaron considerablemente ( $91,2 \pm 11$ ). Aproximadamente el doble de esta cantidad se encontró tanto a las 72 horas como a los 7 días posteriores al trasplante ( $199 \pm 21$  y  $199.5 \pm 32$ ). Como se observa en la Figura 13 a partir de las dos semanas posteriores al trasplante, la presencia de células trasplantadas en estadio mitótico sufrió una importante disminución respecto a los grupos de menor evolución ( $148 \pm 15$ ). El número de células KI-67 positivas en el estriado lesionado después de 21 días de la inyección de CMMA fue menor ( $116 \pm 24$ ) que en grupo anterior (Figura 13).

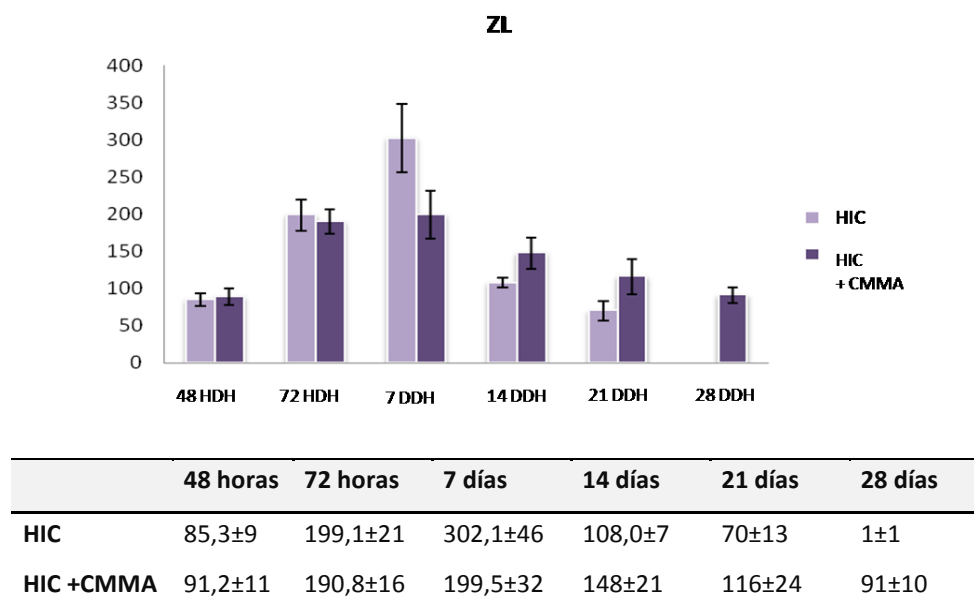


**Figura 13:** Identificación de células mitóticas tras el trasplante de CMMA: A) a las 48 horas en la ZSV B) ZL a las 72 horas C) ZL a los 7 días D) ZL a los 14 días E) ZSV a los 21 días F) ZSV a los 28 días

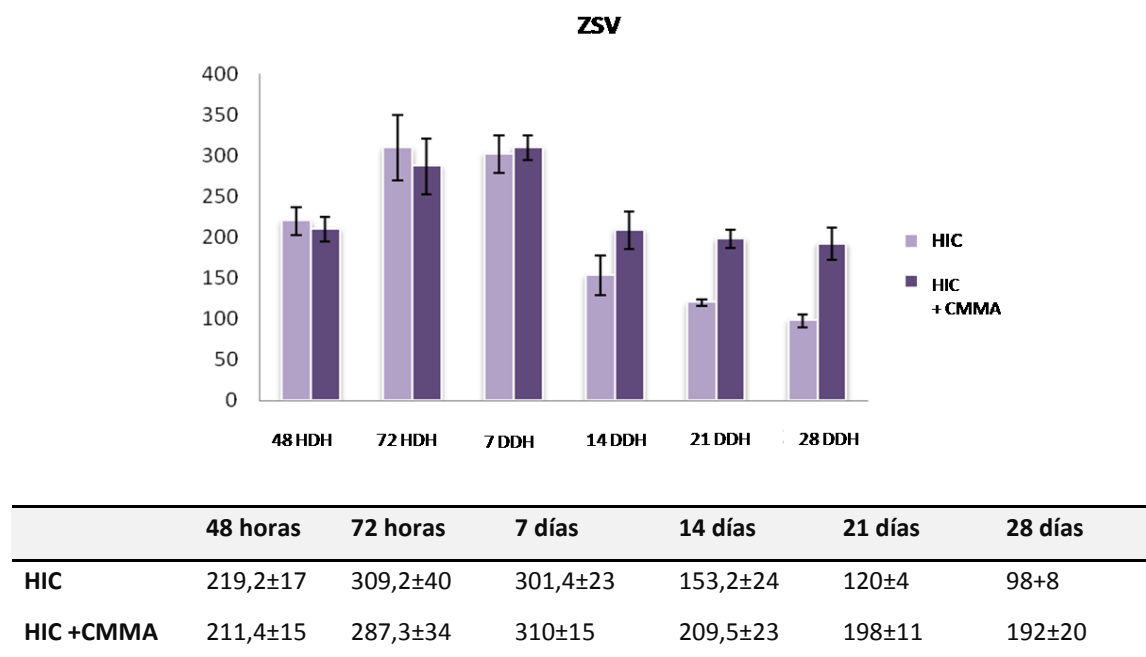
### Análisis cuantitativo de la proliferación como consecuencia del trasplante.

Para analizar la distribución de las células de nueva generación en la ZSV bajo las distintas condiciones experimentales, realizamos el recuento de las células positivas a KI-67, en cada uno de los niveles descritos anteriormente, utilizando el microscopio óptico.

Con el fin de analizar la capacidad de las CMMA de potenciar la actividad proliferativa de las células pertenecientes a ZSV, se realizó un recuento del número de células KI-67 positivas en determinados momentos evolutivos del trasplante (Gráficas 3 y 4).



**Gráfica 3:** Representa el número de células KI-67 positivas en la zona de lesión a distintos tiempos evolutivos tras el trasplante.

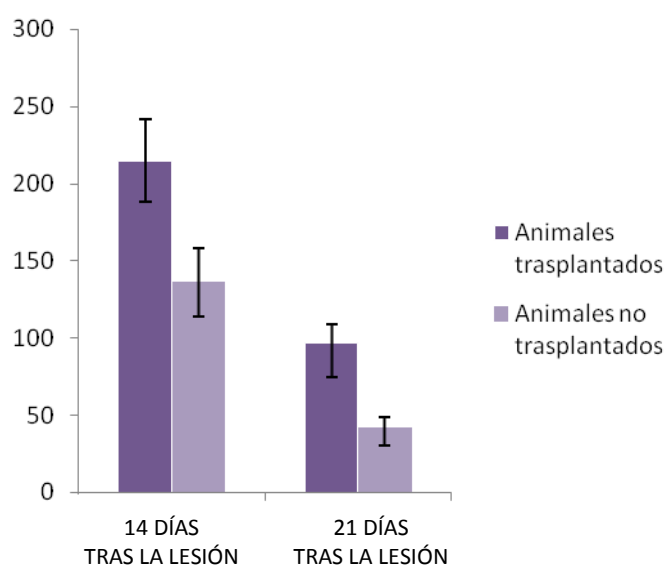


**Gráfica 4:** Representa el número de células Ki-67 positivas encontradas en la zona subventricular a distintos tiempos evolutivos tras el trasplante.



### Estudio de la muerte celular tras el trasplante de CMMA.

En el desarrollo normal de los tejidos, a todo proceso de diferenciación se ve asociada la muerte celular programada. En este apartado se estudia la programación de muerte celular de las CMMA trasplantadas en su proceso de diferenciación hacia células neurales. Los resultados de este estudio demuestran que la programación de muerte celular en CMMA trasplantadas aparece mayoritariamente a partir del día 14 después del trasplante ( $97 \pm 12$ ) en la zona de lesión, momento en el cual se establece el punto álgido de la diferenciación y el comienzo del descenso de la actividad proliferativa de las CMMA. A los 21 días de la administración intracerebral de CMMA la media de estas células que sufre procesos de apoptosis fue de  $42 \pm 7$ , momento en el cual la actividad proliferativa sufrió un descenso considerable.



**Grafica 5:** Representa el número de células apoptóticas en la zona de lesión a los 14 y a los 21 días de la lesión.

### **3.- COMPARATIVA ENTRE DISTINTOS MEDIOS DE SUSPENSIÓN CELULAR EN FASE CRÓNICA**

#### **Estudio de la mejora funcional tras el trasplante de CMMA en animales sometidos a una HIC experimental.**

Para este estudio se han optimizado y adecuado tres sistemas de valoración de las funciones motoras y sensitivas al objeto de una valoración más precisa de la recuperación funcional tras esta forma de terapia celular: un sistema de video-grabación en campo abierto (VTB-test), test de valoración sensitivo-motora y test del rotarod treatmill (Lab-line Instruments, Inc., Melrose Park, IL). Durante el estudio, la totalidad de los animales presentaron una disfunción neurológica después de la lesión cerebral. Sin embargo, la función motora y la coordinación en el grupo de animales que recibió el tratamiento de CMMA mostró una notable recuperación durante todo el seguimiento mientras que la disfunción neurológica de los animales controles no mejoró significativamente a lo largo del seguimiento.

#### **Procesos de evaluación**

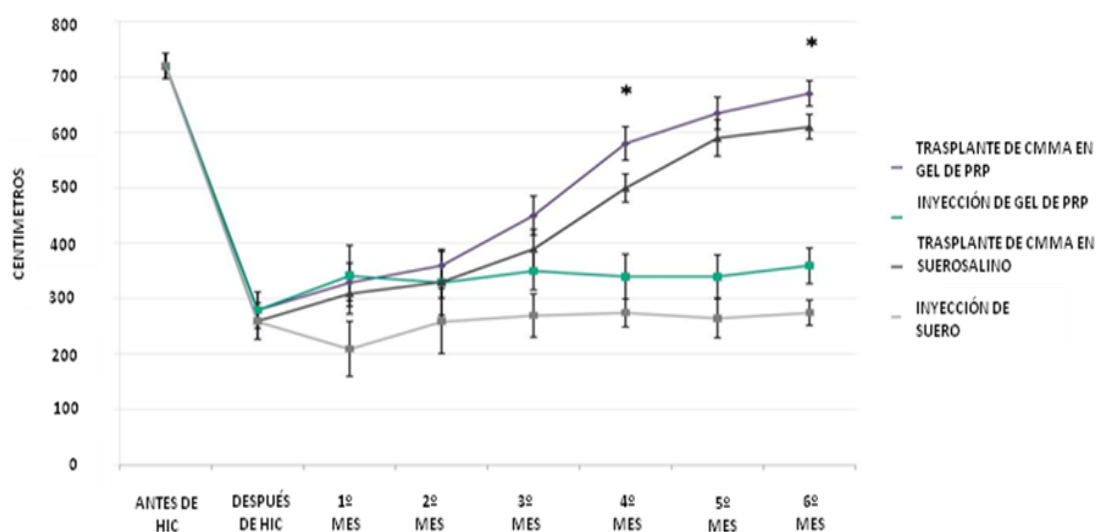
Tras unos estudios estadísticos del modelo experimental se concretó efectuar 3 sesiones de valoración funcional del animal sano al objeto de obtener datos concretos sobre el comportamiento del animal en condiciones normales. Los animales sanos no mostraron asimetrías comportamentales durante las 3 valoraciones. Estos datos se tomaron como referencia a la hora de analizar los déficits funcionales de los animales consecuentes a la lesión cerebral. Los datos se muestran como la media  $\pm$  la desviación estándar de las tres medidas de valoración. Posteriormente a la lesión cerebral se efectuaron 16 sesiones de valoraciones, una vez cada dos semanas durante los 8 meses de duración del estudio (2 meses de cronicidad de la lesión y 6 meses de evolución tras el trasplante). Los datos se muestran como la media  $\pm$  la desviación estándar de los datos mensuales.

#### **Sistema de video-grabación en campo abierto (VTB)**

El software Smart (PanLab Harvard Apparatus, Holliston, Mass., USA) es un sistema de video en campo abierto capaz de evaluar objetivamente el comportamiento que presentan los animales de experimentación. Video-Tracking-Box VTB es una cámara experimental basada en el software Smart y desarrollada con la finalidad de optimizar estudios de actividad locomotora especializada en animales que presentan una lesión cerebral. En este estudio se evaluó a los animales usando diferentes test que

permiten valorar parámetros neurológicos incluyendo déficits en la actividad locomotora. Este parámetro incluye el número total de centímetros que el animal es capaz de recorrer durante los 90 segundos de la grabación.

La media de los valores recogidos por el sistema Smart sobre la distancia total característica que recorrieron los animales sanos durante los 90 segundos de grabación que se evaluaron en la cámara de metacrilato fue de  $720 \pm 23,01$  cm. La distancia recorrida por los animales lesionados se vio significativamente afectada disminuyendo hasta una media de  $279,87 \pm 33,05$  cm debido a la hemiparesia que sufren los animales en el lado contralateral a la lesión y a la falta de coordinación motora y orientación consecuentes al daño cerebral. La distancia recorrida de los animales trasplantados aumentó significativamente a partir del 3º mes. La distancia recorrida por los animales trasplantados con CMMA un soporte derivado de plasma rico en plaquetas, es significativamente superior a partir del 4º mes después del trasplante respecto a los animales que recibieron un trasplante de CMMA disueltas en suero salino  $670.19 \pm 32.25$  cm and  $610,34 \pm 22,01$  respectivamente. (Gráfica 6).

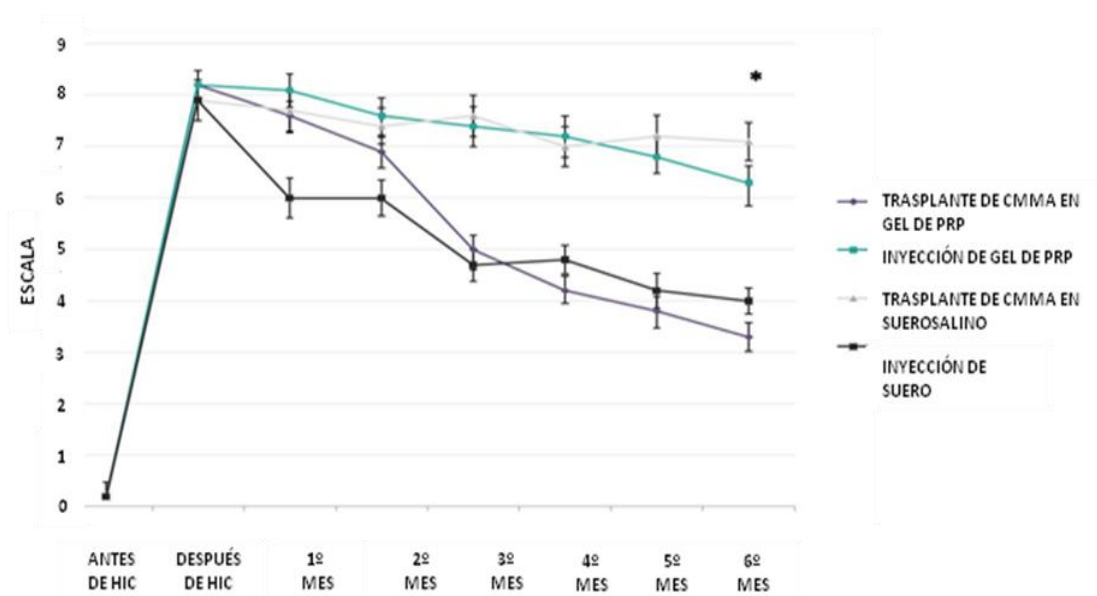


**Gráfica 6:** Representa los resultados obtenidos en el test de la distancia recorrida. La distancia recorrida por los animales trasplantados con CMMA soportadas por un gel derivado de plasma rico en plaquetas, es significativamente superior en el 4º y 6º mes posterior al trasplante respecto a los animales que recibieron un trasplante de CMMA disueltas en suero salino.

#### Test de valoración sensitivo-motora.

Consiste en una escala de 0 a 16 puntos que permite identificar y cuantificar la disfunción motora y sensorial de un animal. En el análisis del test sensitivo-motor los animales lesionados mostraron una clara disfunción sensorial y motora ( $8,18 \pm 1,31$ ) sin

mostrar una mejoría significativa a lo largo del seguimiento. Sin embargo, al tercer mes después del tratamiento, el grupo de animales trasplantados con CMMA mostraron puntuaciones significativamente mejores que el grupo control ( $3,31 \pm 0,28$  y  $6,58 \pm 0,45$  respectivamente) ( $p < 0,05$ ). Los animales sometidos a una inyección intralesional de CMMA soportadas por un gel derivado de plasma rico en plaquetas reproducen una puntuación significativamente menor a partir del 6º mes respecto al grupo de los animales que recibieron un trasplante de CMMA suspendidas en suero salino ( $3,31 \pm 0,28$  and  $4.1 \pm 0,25$  respectivamente) (Gráfica 7).

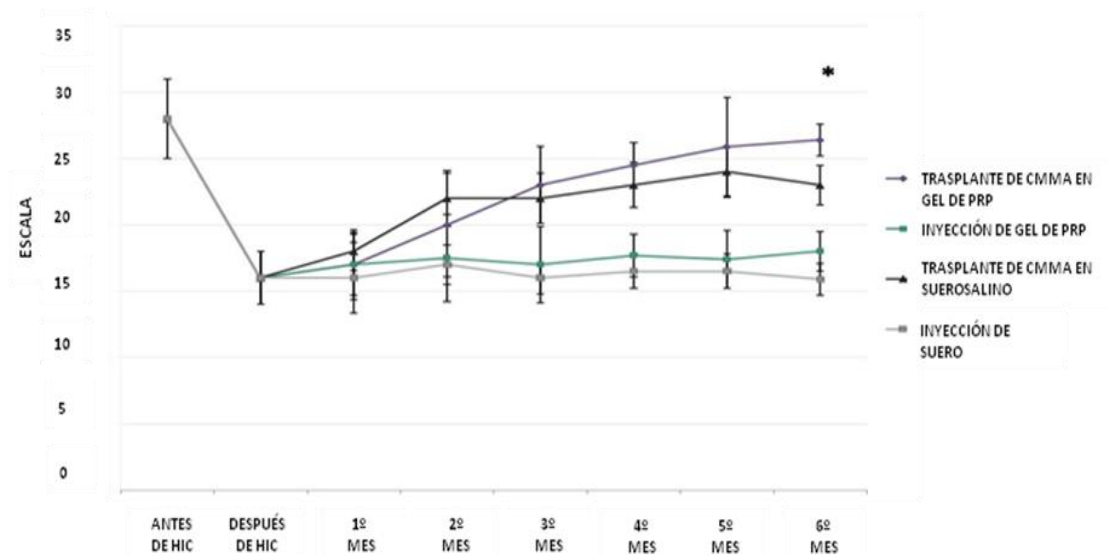


**Grafica 7:** Representa los resultados obtenidos en el test NSS en el estudio de fase crónica. Los animales sometidos a una inyección intralesional de un gel derivado de plasma rico en plaquetas con CMMA reproducen una puntuación significativamente menor a partir del 6º mes respecto al grupo de los animales que recibieron un trasplante de CMMA suspendidas en suero salino.

### Rotarod treadmill

El Rotarod es un sistema de valoración objetivo ampliamente utilizado y aceptado en la literatura para estudiar el equilibrio y la coordinación de los animales en distintos modelos experimentales. En el test del Rotarod, la puntuación media basal obtenida por los animales los tres días anteriores a la lesión fue de  $28.08 \pm 2.87$ . A causa de la disfunción neurológica desencadenada por el daño cerebral, los animales lesionados efectuaron una puntuación ( $16.25 \pm 1.95$ ) significativamente menor que los animales sanos ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, desde el segundo mes hasta el sexto después del tratamiento, la puntuación promedia obtenida en el test de Rotarod mejoró significativamente en el grupo de CMMA trasplantados en comparación con los controles. Los animales sometidos a un trasplante de CMMA embebidas en un gel

derivado de plasma rico en plaquetas mejoran significativamente en el test del Rotarod a partir del 6º mes de evolución del trasplante en comparación a los animales sometidos a un trasplante de CMMA suspendidas en suero salino ( $26,41 \pm 1,23$  and  $23,01 \pm 1,51$  respectivamente) (Gráfica 8).



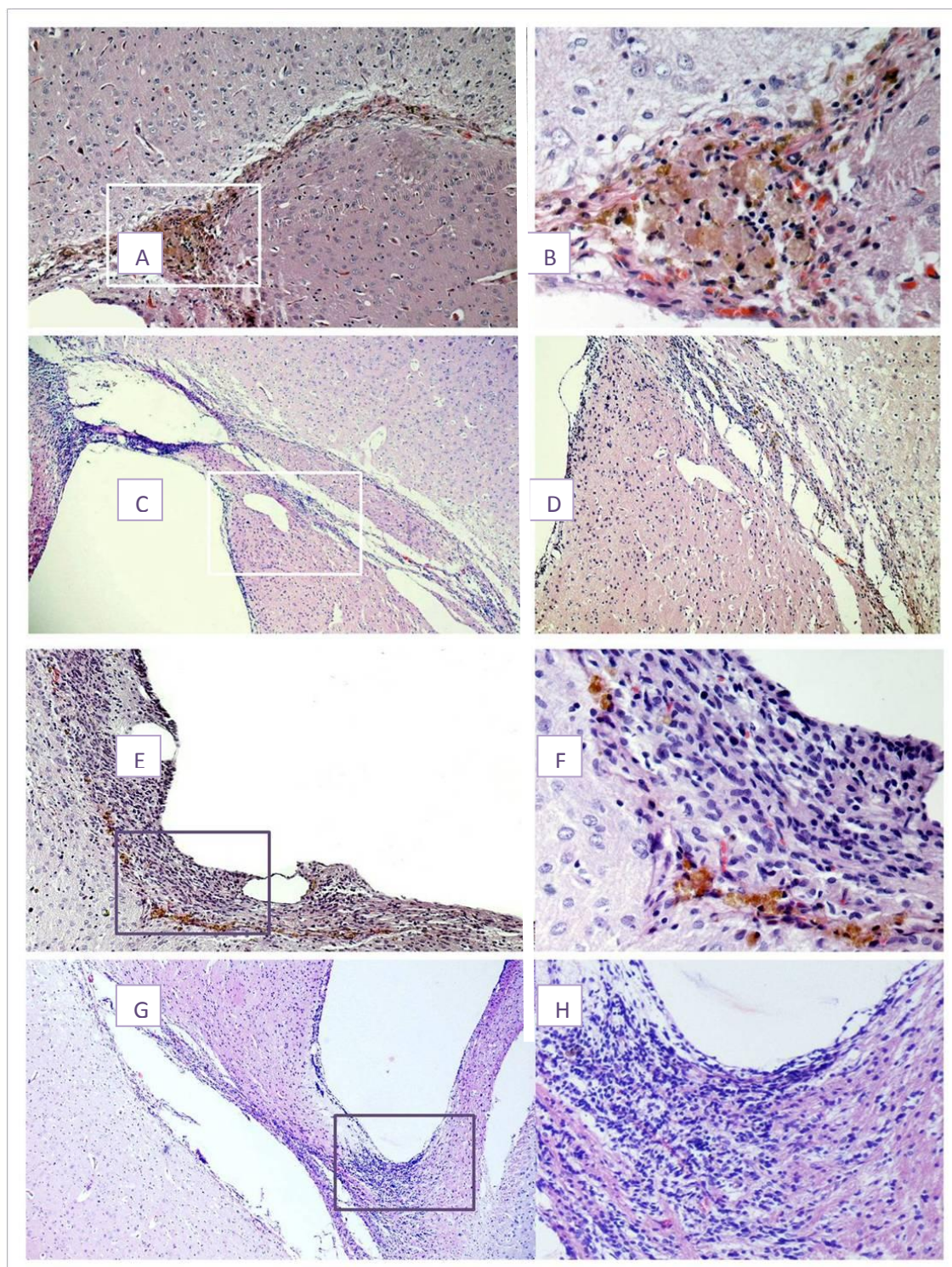
**Gráfica 8:** Representa los resultados obtenidos en el test del Rotarod por los animales pertenecientes al estudio de fase crónica. Los animales sometidos a un trasplante de CMMA sostenidas en un gel derivado de plasma rico en plaquetas mejoran significativamente en el test del Rotarod a partir del 6º mes de evolución del trasplante en comparación a los animales sometidos a un trasplante de CMMA suspendidas en suero salino.

### **Análisis anatómico del tejido cerebral tras el trasplante de CMMA.**

En todos los casos se estudiaron cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina para evaluar los cambios del tejido tras los distintos tratamientos. No se observó en ningún caso crecimiento anormal del tejido producido en el cerebro trasplantado del animal.

Tras el estudio anatómico de las lesiones de los animales 6 meses después del tratamiento, la zona hemorrágica de los animales tratados con CMMA en suero se encontró parcialmente rellena por un tejido neoformado consecuente al trasplante, a diferencia de los animales sometidos a una administración de CMMA soportadas en un gel de PRP donde el nuevo tejido relleno la zona de lesión de los animales trasplantados casi en su totalidad. Además una enorme celularidad se halló en la ZSV de ambos grupos de animales (Figura 14).





**Figura 14:** Técnica de hematoxilina-eosina. A y B) La figura muestra la zona de lesión de un animal trasplantado con CMMA en un gel derivado de PRP. C y D) Muestra la zona hemorrágica de los animales que recibieron CMMA en suero. E y F) La figura muestra el engrosamiento notable de la pared subventricular en los animales trasplantados con CMMA embebida en el gel. G y H), Se observa la ZSV de un animal sometido a un trasplante de CMMA en suero.

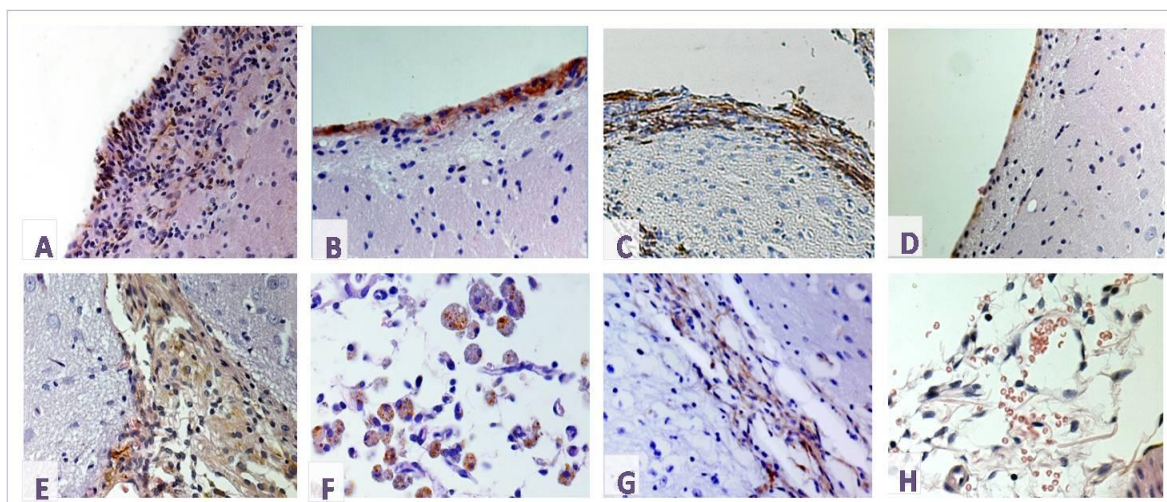
### **Activación de la neurogénesis endógena tras el trasplante de CMMA en fase crónica.**

Como se detalla en el apartado anterior, los animales que reciben un trasplante de CMMA se asocian a un claro incremento en el número de células de la ZSV. Sin embargo, este aumento de la proliferación ventricular fue considerablemente mayor en los animales que recibieron las CMMA soportadas en el gel derivado de PRP.

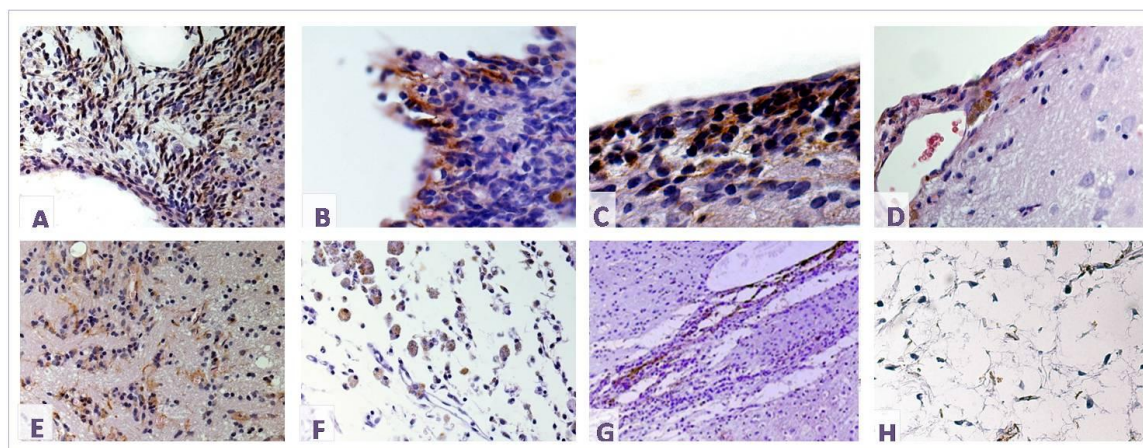
Si bien la presencia de un gran número de células Nestina y Doblecortina positivas fue un hallazgo constante en la ZSV de los grupos de animales que recibieron CMMA, en los animales que recibieron administración de las células en suero, los niveles de expresión de esta proteína fueron inferiores a los encontrados en los animales trasplantados con las células embebidas en el soporte de PRP. Respecto a los resultados obtenidos tras el estudio de la expresión de Nestina en la zona de lesión de los distintos grupos de animales, a los 6 meses del trasplante intralesional de las CMMA en suero, tanto las células Nestina como las Doblecortina positivas rellenan parcialmente el área del estriado lesionado. No obstante, los resultados obtenidos permitieron objetivar, en el caso del material procedente de ratas Wistar que recibieron una administración de CMMA en gel, que las zonas de lesión hemorrágica estaban casi totalmente ocupadas por tractos de tejido y por células que expresaban Nestina y DCX. Los estudios de expresión de las dos proteínas en la cavidad lesionada en los dos grupos de animales controles fueron negativos en cualquiera de los dos casos. Sin embargo, en la ZSV de los animales que recibieron suero salino la expresión de dichas proteínas fue considerablemente menor que en los animales que recibieron gel derivado de PRP.

Estos resultados indican que la administración intracerebral de células mesenquimales en un gel de fibrina potencian la diferenciación tanto de las células madre neurales y la formación de células precursoras de neuronas de la ZSV como de las células que se encuentran en el estriado lesionado (Figuras 15 y 16).





**Figura 15:** Expresión de la proteína Nestina en los diferentes grupos del estudio: Zona subventricular (A) y zona de lesión (E) de un animal trasplantado con CMMA en gel. Expresión de Nestina en un animal sometido a la inyección de un gel derivado de PRP en la zona subventricular (B) y zona de lesión (F). Muestra cerebral de un animal tras de una inyección de CMMA en suero: zona subventricular (C) y zona de lesión (G). Resultados histológicos del estudio de Nestina sobre un animal control que ha recibido suero como único tratamiento: ZSV (D) y zona de lesión (H).



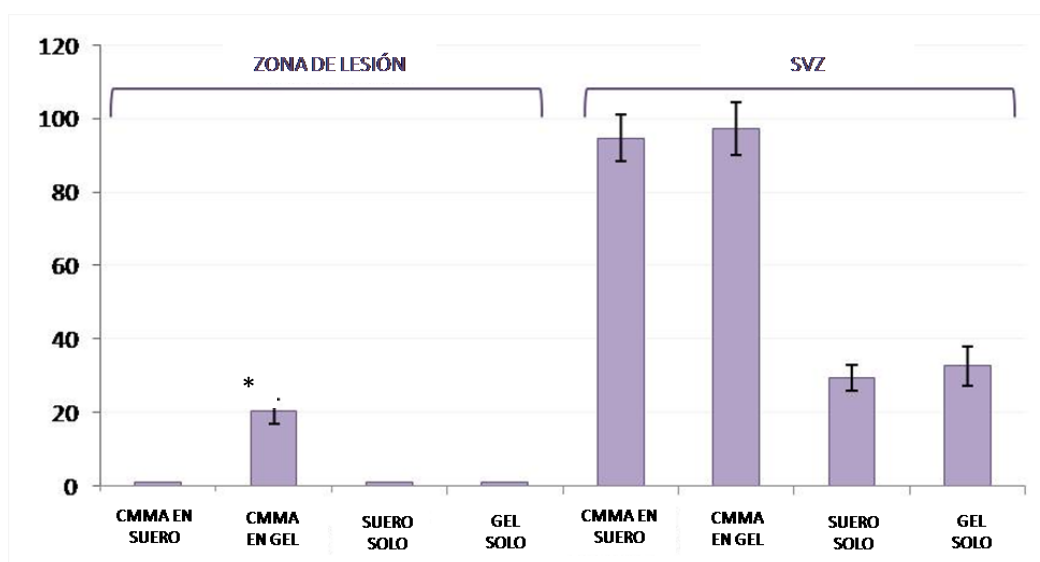
**Figura 16:** Expresión de la proteína Doblecortina en los diferentes grupos del estudio: Zona subventricular (A) y zona de lesión (E) de un animal trasplantado con CMMA en gel. Expresión de Doblecortina en un animal sometido a la inyección de un gel derivado de PRP en la zona subventricular (B) y zona de lesión (F). Muestra cerebral de un animal tras de una inyección de CMMA en suero: zona subventricular (C) y zona de lesión (G). Resultados histológicos del estudio de Doblecortina sobre un animal control que ha recibido suero como único tratamiento: ZSV (D) y zona de lesión (H).



### Variación de la actividad proliferativa inducida por el trasplante según los distintos tipos de soporte de las CMMA.

Al objeto de analizar la capacidad de inducir proliferación celular de los 4 tipos de tratamiento, se estudió la proliferación celular analizando las células en división a través de la medición de las células KI-67 positivas en los distintos ensayos experimentales realizados. Se analizaron las diferencias entre los valores medios de los cuatro grupos de estudio.

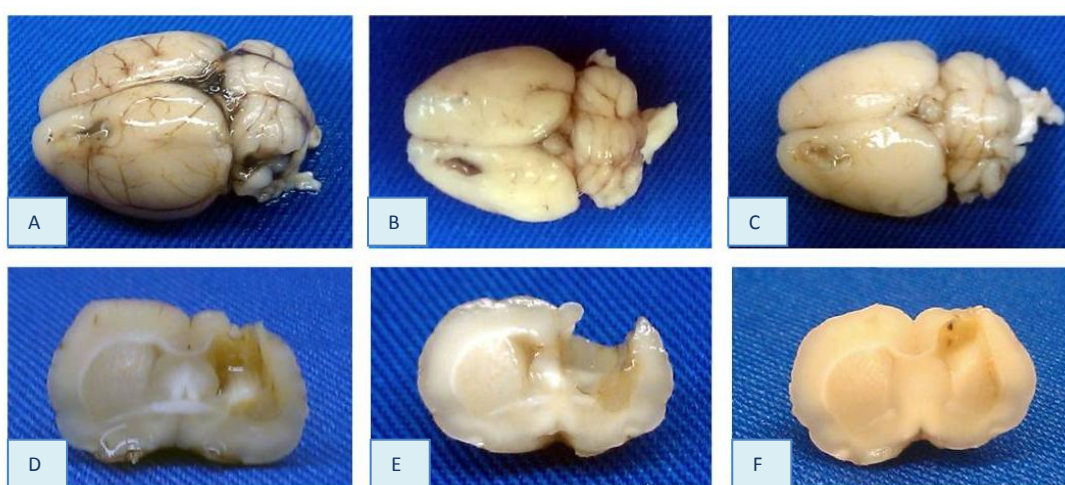
Los resultados expresaron diferencias significativas entre los grupos de animales que recibieron un trasplante de CMMA y los dos grupos controles. Si bien el grupo de animales asociado a una administración de CMMA en gel ( $20.3 \pm 3.4$ ) presentó una mayor actividad proliferativa en la zona de lesión, comparado con los animales que recibieron CMMA en suero, en los que no se observó proliferación celular a los 6 meses del trasplante. No ocurrió así en la zona subventricular, donde no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de animales trasplantados con CMMA en suero salino ( $94,7 \pm 6,4$ ) y el grupo trasplantado con CMMA en un gel ( $97.2 \pm 7.2$ ).



**Gráfica 9:** Representa el número de células mitóticas de los 4 grupos experimentales tanto en la zona subventricular como en la zona de lesión.

### Estudio de variación del volumen de la lesión según los medios de suspensión utilizados en la terapia celular con CMMA.

Tras los resultados obtenidos en este apartado se comprobó como la administración de células mesenquimales reduce el volumen del ictus hemorrágico experimental. El volumen de los animales controles fue  $28.08 \pm 4.54\%$  y  $26,34 \pm 2,98\%$  para el grupo de inyección con suero salino y gel respectivamente. Asimismo, el volumen de los animales tratados con CMMA en suero salino ( $16.91 \pm 2.09\%$ ) fue significativamente mayor que las dimensiones de la lesión en los animales tratados con CMMA en gel ( $15,21 \pm 2.23\%$ ).



**Figura 17:** Imagen macroscópica de la lesión en los diferentes grupos del estudio. Cerebro entero y corte coronal (A y D) de un animal sometido a un trasplante intralesional de CMMA en suero. Muestra cerebral y corte coronal (B y E) de un animal control. Encéfalo y corte coronal (C y F) de un animal trasplantado con CMMA en gel derivado de PRP.

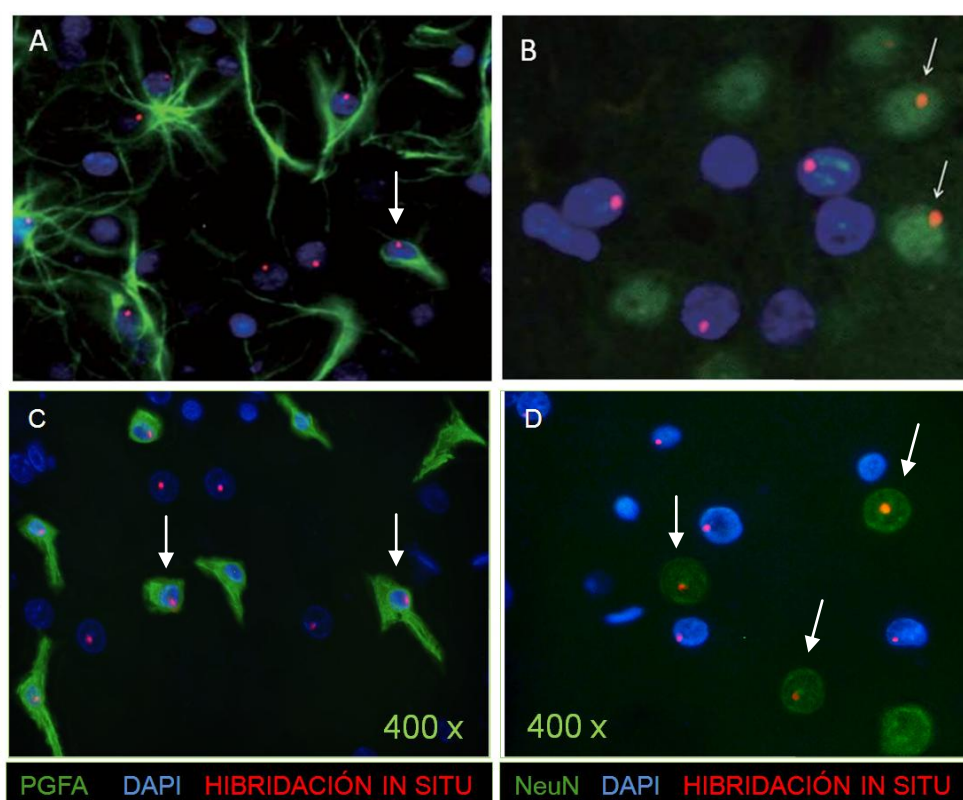
### Transdiferenciación de las CMMA en el tejido lesionado

Con el objetivo de localizar las CMMA inyectadas en el parénquima cerebral se utilizaron células procedentes de donantes macho y se trasplantaron en ratas receptoras hembra. Posteriormente se realizó la técnica de la hibridación in situ con una secuencia específica contra el gen murino Sry, que se encuentra en una región que codifica proteínas encargadas de los caracteres secundarios sexuales masculinos dentro del cromosoma Y identificando así las CMMA trasplantadas al objeto de detectar dichas células de donantes macho.

Los animales que recibieron el trasplante intralesional mostraron CMMA como células aisladas en el interior de la lesión y en sus alrededores. Estas células fueron identificadas como células procedentes de la médula ósea del donante masculino

mediante la técnica de hibridación in situ del gen SRY del cromosoma Y. Algunas de estas células positivas para la hibridación in situ mostraron expresión fenotípica de los anticuerpos PGFA y NeuN (Figura 18) lo que indica la diferenciación de estas CMMA trasplantadas hacia elementos del sistema nervioso central (astrocitos y neuronas respectivamente).

En el grupo de animales trasplantados con CMMA en suero, la media de las células que expresaron positividad para la hibridación in situ del gen SRY del cromosoma Y fue  $17,96 \pm 2,9$ , número significativamente menor que las localizadas en la lesión de animales que recibieron las CMMA en un gel de PRP ( $46,32 \pm 6,1$ ). El porcentaje de las células positivas para hibridación in situ del cromosoma Y que además expresaron PGFA y NeuN fue similar en ambos grupos (61,4% y 17,4% en el grupo trasplantado con CMMA en suero y 59,9% y 19,7% en el grupo de los animales sometidos a un trasplante de CMMA en un gel).

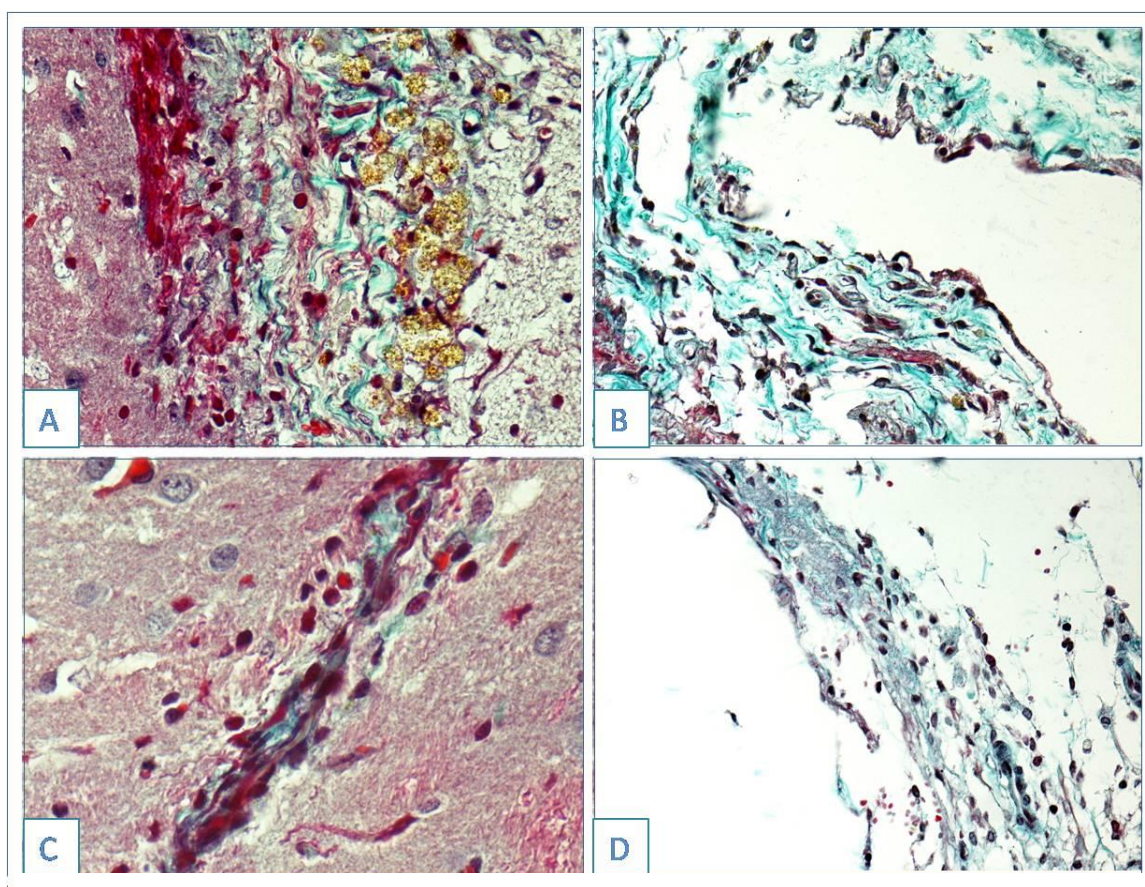


**Figura 18:** Hallazgos inmunohistoquímicos en la zona de la lesión en animales pertenecientes al grupo de los trasplantados con CMMA. A y C: Comarcaje para gen SRY (rojo) y PGFA (verde). Algunas CMMA trasplantadas puede diferenciarse a astrocitos (x400) en los cerebros de los grupos de animales trasplantados con CMMA en suero (A) y en gel (C). B y D: Inmunotinción positiva para el gen SRY (rojo) y NeuN (verde). Este comarcaje implica que algunas CMMA trasplantado se han diferenciado a neuronas (flechas) y sobrevivir a largo plazo después del trasplante (x 1000) en los cerebros de animales trasplantados con CMMA en suero (B) y en gel (C).



### Tricrómico de Masson

Tras analizar los resultados de la técnica de tricrómico de Masson se comprobó que gran cantidad de los componentes que rellenan la zona intralesional después del trasplante no son únicamente fibras de colágeno de tejido conjuntivo que tratan de cicatrizar el daño tisular (Figura 19).



**Figura 19:** Tricrómico de Masson. Se observa teñido de azul las fibras de colágeno; de morado los núcleos celulares y de rojo los citoplasmas de las células. Representa tejido cerebral sometido a una HIC con los siguientes tratamientos: A) trasplante de CMMA en suero salino. B) Inyección intralesional de suero salino. C) Trasplante de CMMA soportadas con un gel derivado de PRP. D) Administración de un gel derivado de PRP.

## **VI. DISCUSIÓN**

## VI. Discusión

---

Actualmente, las lesiones del sistema nervioso constituyen uno de los principales problemas sanitarios de los países desarrollados. El ictus cerebral hemorrágico es una de las formas más devastadoras de daño cerebral y la tercera causa de muerte en los países en vías de desarrollo. El 38% de los pacientes sobreviven el primer año a este tipo de ictus, pero la hemorragia cerebral conduce a graves deficiencias neurológicas, y por eso se considera la enfermedad vascular cerebral como la causa más frecuente de incapacidad neurológica. Los factores que comportan mayor riesgo en las lesiones vasculares del cerebro son la hipertensión y la aterosclerosis, desgraciadamente enfermedades que padece un elevado porcentaje de la población adulta en España. Las consecuencias neurológicas de una hemorragia cerebral estarán en función de la localización y extensión del tejido cerebral lesionado. Los síntomas son variables en función de la parte del cerebro que haya sido afectada. Una hemorragia cerebral en función de su severidad, puede provocar trastornos como el mareo, pérdida parcial de la visión o de la audición, parálisis de las extremidades, o trastornos de la misma en un brazo o una pierna, o en un lado del cuerpo, lenguaje ininteligible, incontinencia urinaria, pérdida de memoria, entre otros (Andres et al., 2008; Bissell and Radisky, 2001; Ferro, 2006).

La recuperación de todos estos defectos neurológicos depende principalmente de la gravedad de la lesión cerebral residual. Una característica común en este tipo de enfermedades es la alteración de tejidos y/o la desaparición de ciertos tipos celulares. Los fármacos utilizados en el tratamiento de estas enfermedades frecuentemente palian únicamente los síntomas y van dirigidos a la prevención del ictus en vez de reparar el daño tisular. Como consecuencia, desgraciadamente no existe ningún tratamiento efectivo para mejorar el déficit funcional residual de este tipo de daño cerebral (Andres et al., 2008)

Precisamente, el objetivo de la terapia celular es restaurar esos componentes dañados o ausentes y como consecuencia recuperar la función del órgano en este tipo de enfermedades. Por esta razón, la terapia celular aplicable a lesiones del sistema nervioso se configura como una línea de investigación de importancia creciente y de acuerdo con las publicaciones de la literatura de los últimos años, es de suponer que representará en un futuro una forma de terapia consolidada en clínica humana (Vaquero

et al., 2006; Vaquero and Zurita, 2009; Vaquero and Zurita, 2011; Zurita et al., 2008b; Zurita and Vaquero, 2004; Zurita and Vaquero, 2006).

Las aproximaciones de la terapia celular son muy variadas: el uso de células autólogas (del propio paciente), alogénicas (de un donante), xenotransplantadas (procedentes de animales generalmente), el uso de células madre adultas o embrionarias, células humanas modificadas genéticamente para producir determinadas sustancias o células transdiferenciadas que ejercen funciones celulares que antes le eran ajenas.

Existe un gran número de evidencias experimentales que apoyan la idea de que las células madre adultas poseen la capacidad de generar distintos tipos celulares especializados, diferentes al de su origen embrionario. Una de las fuentes importantes de células madre adultas es la médula ósea donde se encuentran las células madre mesenquimales. Los progenitores mesenquimales son un grupo de células madre adultas que fueron caracterizadas por Friedenstein, quien las aisló de la médula ósea y las describió como células adherentes de morfología fibroblastoide, capaces de diferenciarse hacia células de origen mesodérmico como osteocitos, condrocitos y adipocitos (Friedenstein et al., 1976). Varios estudios han asignado a este grupo celular diversos nombres como: Células de Estroma Medular, Unidades Formadoras de Colonias Fibroblastoides, Precursores Estromales ó Células Adultas Progenitoras Multipotentes o MAPCs (Multi-Potent Adult Progenitor Cells). En el año 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular ó ISCT (Internacional Society Cellular Therapy) propuso tres criterios para definir las células madre mesenquimales:

- Estas células deben ser adherentes en cultivo.
- Expresar los antígenos CD73, CD90 y CD105 en ausencia de antígenos hematopoyéticos como CD34, CD45, marcadores de monocitos, macrófagos y linfocitos B.
- Las CMM deben ser capaces de diferenciarse in vitro en osteoblastos, adipocitos y condrocitos bajo condiciones estándar de cultivo.

En los últimos años, diversos autores han demostrado que la administración de células madre adultas tras una lesión en el Sistema Nervioso permite obtener signos de recuperación funcional (Vaquero and Zurita, 2009; Zurita et al., 2008a; Zurita et al., 2008b; Zurita and Vaquero, 2004; Zurita and Vaquero, 2006).

Estas células presentan algunas ventajas a la hora de aplicar su trasplante a la clínica. Están presentes en distintos tejidos del individuo adulto, como médula ósea,

tejido adiposo, cordón umbilical, etc. Una de las fuentes más importantes de obtención de células madre adultas propuesta en investigación para terapias celulares es la médula ósea. Las CMMA que residen en la médula ósea participan en la formación de un microambiente que favorece la hematopoyesis.

Las células madre mesenquimales procedentes de la médula ósea son relativamente fáciles de aislar y sencillas de manipular in Vitro (Friedenstein et al., 1976). Al mismo tiempo, estas células poseen baja antigenicidad, lo que permite que el trasplante pueda ser tanto autólogo como heterólogo. Sin embargo, existen aún diversas cuestiones sobre los mecanismos de acción que presentan estas células al participar en la regeneración tisular. Originariamente, se pensaba que las CMMA eran células capaces de diferenciarse a elementos únicamente procedentes del mesodermo, como osteoblastos, adipocitos y condrocitos o células musculares. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado la capacidad de transdiferenciación de las CMMA. Existe un gran número de evidencias experimentales que apoyan la idea de que las células madre adultas poseen la capacidad de generar distintos tipos celulares especializados, diferentes al de su origen embrionario. Los datos recogidos de la literatura sugieren que las CMMA tienen la capacidad de transdiferenciarse in Vitro hacia células nerviosas (Sanchez-Ramos et al., 2000; Woodbury et al., 2000) característica muy ventajosa en la utilización de estas células como terapia celular en las lesiones del Sistema Nervioso. Por ejemplo, distintos estudios realizados sobre mujeres receptoras de trasplantes de médula ósea de donantes varones han demostrado mediante hibridación in situ del cromosoma Y la presencia de células de médula ósea del donante masculino en el cerebro adulto de la hembra receptora transdiferenciadas hacia neuronas (Mezey et al., 2003).

Como consecuencia de estas observaciones surgió la idea de este trabajo. La aportación experimental de esta investigación, desde el punto de vista de la trascendencia clínica, es la demostración de que la terapia celular con CMMA en animales sometidos a hemorragia intracerebral es efectiva en situaciones crónicas, lo que permite una posible aplicación en pacientes con una lesión cerebral crónicamente establecida (Otero et al., 2011).

En previos estudios de este laboratorio se ha demostrado que la administración intracerebral de células alogénicas obtenidas del estroma de la médula ósea 72 horas después de una hemorragia cerebral puede restaurar las funciones neurológicas suprimidas previamente por la lesión cerebral (Otero et al., 2010a). Desafortunadamente, en el transcurso de los primeros días después de un accidente



cerebrovascular hemorrágico, el enfermo podría ser inestable y una cirugía adicional podría ser perjudicial para el paciente. Sin embargo, una estrategia experimental de la terapia celular se podría aplicar en pacientes en una fase crónica del daño cerebral hemorrágico. Dos meses después de la HIC el paciente se encuentra estable y en estas circunstancias, sería posible la administración local de CMMA autólogas. Esta característica ofrece una ventaja adicional, y es que hace innecesaria la inmunosupresión. Por esta razón, se ha diseñado este estudio aplicable a la clínica, en el que los animales son sometidos a una hemorragia intracerebral crónica y posteriormente se les administra CMMA por vía intracerebral. Asimismo, se ha desarrollado una estrategia de extraordinaria eficacia para aumentar la supervivencia celular de las CMMA trasplantadas mediante el uso de un gel derivado de PRP.

En este estudio se demuestra que después de la inducción experimental de una hemorragia intracerebral en animales, aparece una disfunción neurológica significativa y mantenida. Sin embargo, pocos meses después de la hemorragia intracerebral crónica, una administración intralesional de CMMA alogénicas inicia una recuperación funcional notable. Esta recuperación es claramente significativa en comparación con los animales controles a los tres meses después del tratamiento y continúa al menos 6 meses después del trasplante.

Parece evidente el beneficio funcional que se confieren las CMMA trasplantadas tras una lesión cerebral, sin embargo, el mecanismo de acción de dichas células es aún desconocido.

Clasicamente se consideraba que los centros del SNC adulto y las vías nerviosas eran algo fijo, órganos estáticos cuya organización quedaba definida estructural y funcionalmente una vez finalizado el desarrollo embrionario (Ramón y Cajal, 1914), aunque, ya a principios del siglo XX, Santiago Ramón y Cajal plasmó de forma implícita el concepto de plasticidad neuronal en su hipótesis referente al enriquecimiento de los circuitos neuronales como sustrato material potencial del “perfeccionamiento de las aptitudes psíquicas” (Ramón y Cajal, 1909). Posteriormente se acuñó el término plasticidad cerebral (HEBB and KONZETT, 1949) como la capacidad del cerebro para adaptarse a una nueva situación, sin importar la causa originaria (maduración, aprendizaje, cambios ambientales o enfermedad). De hecho, se ha demostrado que el sistema nervioso es capaz de responder a estas situaciones mediante mecanismos que permiten la reorganización estructural y/o funcional, para minimizar los efectos de dichas alteraciones (Aguilar-Rebolledo and Mateos-Gomez, 1989; Wang and Feuerstein, 1995). En un principio, la comunidad científica relacionaba los procesos de

plasticidad en el cerebro adulto exclusivamente con sutiles modificaciones funcionales y anatómicas. La ausencia de figuras mitóticas en las neuronas y la irreversibilidad de las lesiones cerebrales reforzaban el poder dogmático que poseía la creencia inicial de que la neurogénesis estaba limitada al periodo embrionario. Sin embargo, este concepto ha cambiado desde los trabajos de Altman a nuestros días (ALTMAN, 1969; Lledo et al., 2006). Si bien es cierto que cuando comparamos la neurogénesis que tiene lugar en el Sistema Nervioso Central adulto con el extensísimo proceso neurogénico que ocurre durante los procesos de desarrollo embrionario, la neurogénesis adulta parece un proceso secundario; también es cierto que existen determinadas áreas del cerebro donde, por así decirlo, el desarrollo nunca termina. Además, el hecho de que exista neurogénesis en diversos grupos animales indica que no se trata de un fenómeno excepcional y que la producción de nuevas neuronas en el cerebro adulto es un fenómeno conservado a lo largo de la evolución (ALTMAN and CHOROVER, 1963; Eriksson et al., 1998).

Los precursores primarios del SNC adulto se han identificado en zonas especializadas denominadas “nichos neurogénicos”, que parecen ser vestigios del programa de desarrollo que inicia la formación del cerebro (Corotto et al., 1993; Kuhn et al., 1996; Lois and Alvarez-Buylla, 1994; Luskin, 1993; van et al., 2002). Hasta el momento solamente se han descrito dos áreas neurogénicas donde se ha documentado la existencia de neurogénesis en el cerebro adulto: la zona subventricular/sistema olfatorio y el giro dentado del hipocampo (ALTMAN, 1969; ALTMAN and Das, 1965; Carleton et al., 2003; Eriksson et al., 1998; Hastings and Gould, 1999; van et al., 2002). En particular, en roedores, en regiones del hipocampo donde la rotación de las células neuronales es robusta, las células precursoras en el giro dentado parecen proliferar de forma continua y migran hacia la capa de células granulares, en última instancia, las neuronas del hipocampo se diferencian en células granulares. Mientras que varios tipos de lesiones cerebrales, se ha demostrado que reducen el número de células neuronales como consecuencia de la muerte celular, los estímulos generados por el daño también parecen regular la proliferación y diferenciación de células en la ZSV y en el giro dentado del hipocampo sintetizando nuevas neuronas (Gould and Tanapat, 1997).

Sorprendentemente, Bigham B y col. publicaron en el 2005 que el accidente cerebrovascular además de potenciar neurogénesis endógena en el hipocampo, induce también la activación de la caspasa 3, no sólo en la región CA1, sino también en la zona subgranular. Los resultados de su trabajo sugieren que la muerte celular por apoptosis

de células neurogénicas podría mediar en la pérdida de estas células antes de migrar a la zona de lesión.

Además, se han aislado células con propiedades de células madre *in vitro* en áreas no neurogénicas tales como el septo, el estriado, la corteza cerebral, el cuerpo calloso y el nervio óptico (Palmer et al., 1995; Palmer et al., 1999). Sin embargo, estas regiones son consideradas no neurogénicas por carecer de un ambiente permisivo para que la neurogénesis tenga lugar, de modo que si se implanta un progenitor neural dentro de estas regiones, esta célula nunca dará lugar a células de estirpe neuronal, si no que originará una célula glial o morirá (Ortega-Perez et al., 2007).

Los nichos neurogénicos dentro del SNC adulto poseen características anatómicas e histológicas que son esenciales, tanto para el mantenimiento como para la regulación de la neurogénesis. Entre éstas cabe destacar el hecho de que las células progenitoras neurales estén próximas a los capilares, los endotelios y los astrocitos, lo cual les proporciona unas características especiales que hacen posible la generación de nuevas células (Arias-Carrion and Drucker-Colin, 2007).

Se ha demostrado que algunos neurotransmisores influyen en la regulación de la neurogénesis adulta. Entre estas moléculas destacan la dopamina, la serotonina, la acetilcolina y el glutamato. Todos ellos inducen un aumento de la tasa proliferativa (Cardenas et al., 2005; Hagg, 2005; Ming and Song, 2005). El óxido nítrico, sin embargo, parece que ejerce un papel inhibitorio en la regulación de la proliferación celular, presumiblemente a través de un bloqueo de los receptores para el EGF (del inglés, epidermal growth factor) (Matarredona et al., 2005; Torroglosa et al., 2007). Por otro lado, algunas de estas moléculas también ejercen su efecto sobre la supervivencia de las células, como es el caso de la serotonina, papel que lleva a cabo a través del BDNF (del inglés, brain-derived neurotrophic factor) como mediador (Banasr et al., 2004; Mattson et al., 2004).

De entre los aspectos más importantes en el nicho neurogénico cabe destacar el mantenimiento de una población de células madre en un estado indiferenciado a la vez que se promueve la diferenciación de su progenie. Existen dos moléculas candidatas a las que se les ha atribuido el mantenimiento de esta función: Noggin/BMPs (del inglés, bone morphogenic proteins) y Notch (Conover and Allen, 2002). Las cascadas de señales en las que participan estas proteínas determinan que las células madre se mantengan como tales y proliferen, o salgan del ciclo y se diferencien a linaje glial o neuronal (Artavanis-Tsakonas et al., 1995; Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Lim et al.,

2000). Otros factores influyen directamente en la tasa de proliferación: EGF, FGF (de inglés, fibroblast growth factor), CNTF (del inglés, circulating tumour necrosis factor), VEGF y TGF $\alpha$  (del inglés, transforming growth factor), que incrementan la tasa proliferativa, mientras que TGF $\beta$  la disminuye (Doetsch et al., 2002; Emsley and Hagg, 2003; Hagg, 2005; Kuhn et al., 1996; Pencea et al., 2001; Tropepe et al., 2000).

En este trabajo se ha demostrado la capacidad de plasticidad cerebral tras una hemorragia cerebral, la posibilidad y el alcance de la respuesta de la proliferación celular después de la hemorragia en un área donde la neurogénesis se mantiene hasta la edad adulta. Mediante el uso del antígeno Ki-67, se cuantificó el número total de células que se dividieron en diferentes fases (24, 48, 72 horas, 7, 14, 21, 28 días, 6 y 12 meses) en la ZSV después de una lesión hemorrágica en el estriado. La identidad de estas células en proliferación se determinó mediante una inmunohistoquímica con los anticuerpos PGFA, Nestina y DCX. Los resultados de los experimentos que se desarrollan en este trabajo, en concordancia con otros estudios experimentales (Chirumamilla et al., 2002; Zhang et al., 2001), demuestran que las lesiones cerebrales inducen toda la serie de procesos cerebrales que subyacen al desarrollo neuronal, comenzando con la división de un precursor y terminando con la presencia y la supervivencia de una nueva neurona madura que trata de incorporarse e integrarse en la zona de lesión para reemplazar así la pérdida celular provocada por el daño cerebral.

Los fenómenos de proliferación celular en la ZSV ocurren de forma más prominente desde las 72 horas hasta los 7 días posteriores a la inducción de la hemorragia cerebral. Sin embargo, la proliferación celular disminuye en un 80% a los 28 días perdurando en bajos niveles hasta los 12 meses. Los resultados de este estudio determinan que la división de los precursores conduce a distintos procesos de diferenciación neural, tanto neuronal como glial. La neoproducción de elementos gliales ocurre principalmente en las primeras etapas de la evolución de la lesión, entre las 48 y las 72 horas del ictus hemorrágico. Estos resultados son consistentes con otras investigaciones (Doetsch et al., 1999) que hipotizan que las células PGFA positivas corresponden a células neurales que se dividen en las etapas posteriores a una lesión cerebral. Por otra parte, las células gliales en general, y los astrocitos en particular, cumplen un papel esencial en la formación del nicho neurogénico, de modo que se ha comprobado que son capaces de controlar múltiples pasos de la neurogénesis adulta; desde la proliferación, especificación y migración celular hasta la integración de dichas células en los circuitos preexistentes (Ma et al., 2005). Sin embargo, a partir de las 72 horas se generan de forma mayoritaria células que expresan las proteínas Nestina y Doblecortina. La Nestina

es una proteína expresada por las células inmaduras que se encuentran en procesos de diferenciación neural, tanto glial como neuronal. El gen *dcx* fue identificado a finales de la década de los noventa (des, V et al., 1998; Gleeson and Walsh, 2000). La DCX es una proteína específica de precursores neuronales, no habiéndose detectado en células gliales (Rao and Shetty, 2004). Se expresa en los cuerpos celulares y en los procesos de células en migración, tanto en orientación tangencial como en orientación radial, e incluso en células en proceso de diferenciación temprana (Couillard-Despres et al., 2001; des, V et al., 1998; Francis et al., 1999; Gleeson et al., 1999). Rara vez se ha encontrado en neuronas que presentan morfología de célula diferenciada, esto solo se ha observado en la corteza piriforme y en el bulbo olfatorio. Su expresión comienza en el momento en que son generados los neuroblastos, alcanzando su pico máximo de expresión alrededor de la segunda semana de vida de la célula, para posteriormente, perderse de forma progresiva hasta hacerse prácticamente indetectable a los dos meses (Brown et al., 2003).

Estos resultados sugieren que tras una hemorragia cerebral primeramente se dividen las células madre neurales que expresan PGFA para posteriormente diferenciarse tanto a células de glia como a neuronas. Esta estimulación de la neurogénesis endógena promovida por la hemorragia cerebral podría estar causada por distintos factores moleculares que incluyen factor de crecimiento fibroblástico, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento insulina tipo 1, sonic hedgehog, y el factor neurotrófico derivado del cerebro.

Además, el presente estudio ha permitido demostrar que tras una hemorragia cerebral, se produce un aumento en la cantidad de células que expresan factores de angiogénesis, tales como el VEGF contribuyendo a la formación de un lecho vascular en el tejido huésped, y por tanto a la angiogénesis y vasculogénesis del núcleo estriado previamente lesionado para contribuir a la regeneración del tejido dañado.

En este sentido se ha comprobado que las células endoteliales liberan factores solubles que estimulan la auto-renovación de las células madre neurales, inhibiendo su diferenciación (Shen et al., 2004). Además los capilares sanguíneos aportan un soporte trófico y metabólico y, de hecho, se cree que existe una estrecha relación entre la regulación de los procesos de neurogénesis y de angiogénesis.

En un cerebro sano adulto, las células que se originan en la ZSV adulta son capaces de migrar una larga distancia hacia el bulbo olfatorio (BO) (Lois and Alvarez-Buylla, 1994; Luskin, 1993). Se ha estimado que, en el ratón, los neuroblastos tardan en

alcanzar el BO desde la ZSV entre 5 y 7 días (Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo, 2002). Además de migrar, los progenitores neuronales se detienen ocasionalmente para dividirse, sufriendo rondas sucesivas de entrada y salida del ciclo celular.

La migración tangencial de los precursores interneuronales transcurre a través de una ruta restringida de migración conocida como CMR (Kornack and Rakic, 2001). Este desplazamiento de los precursores neuronales a través de la CMR se ha denominado migración en cadena y se ha descrito como de tipo tangencial.

Las cadenas formadas por los neuroblastos están rodeadas por una malla constituida por procesos de astrocitos con características muy peculiares (Lois et al., 1996; Peretto et al., 1997; Thomas et al., 1996).

Los neuroblastos de la ZSV adulta son capaces de proliferar a la vez que están migrando, sufriendo rondas sucesivas de entrada y salida del ciclo celular durante su desplazamiento (Coskun and Luskin, 2002; Smith and Luskin, 1998), a diferencia de lo que ocurre con el resto de células migrantes que son consideradas, todas ellas, postmitóticas (Thomas et al., 1996).

Aunque los mecanismos de migración tangencial han sido estudiados de forma extensa, los factores que la controlan son todavía, en gran medida, desconocidos.

Los resultados de este trabajo sugieren que los precursores neuronales que se forman como consecuencia de la lesión en la ZSV modifican su CMR hacia la zona de lesión al objeto de generar nuevas neuronas maduras que se incorporen y se integren en la zona de lesión reemplazando así la pérdida celular provocada por el daño cerebral.

En el presente trabajo se demuestra como a los 7 días posteriores a la inducción de una HIC experimental la mayoría de los precursores proliferativos procedentes de la ZSV se encuentran en el interior de la lesión y sus alrededores. Interesantemente, la migración de los precursores celulares no parece ser homogénea al llegar a la lesión. Estas células migratorias se organizan en distintas zonas de la lesión en función de la estirpe celular a la que se diferencien. Los resultados de los comarques fluorescentes obtenidos en este trabajo demuestran como las células proliferativas que obtienen un fenotipo glial migran desde la ZSV hacia los alrededores de la lesión, mientras que aquellas células procedentes de la ZSV que se diferencian hacia una estirpe neuronal se introducen en el núcleo del parénquima lesionado. El origen de la explicación de este fenómeno se encuentra en el desarrollo embrionario. Durante el este periodo la glía

radial forma una especie de soporte o andamiaje físico que pone en contacto la zona ventricular con la superficie pial, actuando así de guía para aquellos neuroblastos que están migrando hasta sus destinos finales (Krupinski et al., 1994; Robin et al., 2006; Zhang et al., 2004). Cada una de las células de glía radial posee un cuerpo celular localizado en la zona ventricular y un elaborado proceso que se extiende a través de la pared del tubo neural hasta alcanzar la superficie pial donde se ancla a la membrana basal (Ramón y Cajal, 1911; (Schmechel and Rakic, 1979). Una vez que cesa la producción neuronal, las células de glía radial retraen sus procesos y acaban diferenciándose a astrocitos. El cuerpo estriado del cerebro adulto, no contiene glía radial ni tubos gliales y los neuroblastos neoformados tienen la necesidad de algún otro andamio físico para su migración. En concordancia con este papel migratorio se ha sugerido que las células PGFA positivas pueden tener propiedades similares a la de la glía radial facilitando así la migración por el tejido cerebral adulto. Estas células no son sólo meros elementos estáticos de soporte, si no que podrían ser componentes dinámicos ya que son capaces de sufrir mitosis y originar neuronas, representando, por tanto, un estadio intermedio en el linaje de células madre del SNC (Heins et al., 2002; Malatesta et al., 2000). Por esta razón, los resultados de este trabajo manifiestan como las células PGFA positivas aparecen en los alrededores de la lesión y las DCX positivas en el núcleo de la lesión. En este trabajo queda demostrada la presencia de células neoformadas que aparecen a partir del 7º día de evolución de la lesión y cuya función es rellenar parénquima lesionado, sin embargo el origen de todas las células es aún desconocida. Algunos autores han revelado datos a favor de que el núcleo estriado de los animales adultos contiene un subconjunto de células capaces de desarrollar un fenotipo neural maduro. Según esta teoría, algunas de las células encontradas a partir del séptimo día de la inducción de la lesión hemorrágica puede provenir del propio parénquima estriatal. Sin embargo, algunos autores no consideran a esta región una zona neurogénica por carecer de un ambiente permisivo para que la neurogénesis tenga lugar, de modo que si se implanta un progenitor neural en su interior, nunca dará lugar a células de estirpe neuronal, si no que originará una célula glial o morirá (Ortega-Perez et al., 2007).

Desafortunadamente, los resultados de este trabajo demuestran que a pesar de la oleada de génesis de nuevas células después de la hemorragia entre los días 7 y 14 posteriores a la lesión, la mayoría de estas células no sobreviven más de 3 semanas. Así, el ímpetu del cerebro adulto en restaurar el daño secundario de una hemorragia cerebral no llega a término por varias posibles razones:

En primer lugar, el número absoluto de células madre en el SNC adulto es relativamente bajo en relación con el número total de células necesarias para regenerar por completo el volumen de masa encefálica perdida tras un ictus hemorrágico. Ya que estas células en el cerebro adulto están restringidas a dos únicos nichos neurogénicos donde se mantiene un microambiente separado, especializado y exquisitamente regulado (Conover and Allen, 2002; Lim et al., 2000).

En segundo lugar, en el cerebro sano adulto las células que migran tangencialmente a través de la CMR al bulbo olfatorio migran a través de cadenas formadas por procesos de astrocitos previamente establecidas. Tras una hemorragia cerebral, estas cadenas de astrocitos tienen que formar un nuevo camino con el objeto de conducir las células neoformadas a la zona de lesión. La migración radial que debe tener lugar una vez los neuroblastos alcanzan la zona de lesión mediante la CMR tiene lugar en ausencia total de glía radial, aunque hoy en día se especula acerca de si los vasos sanguíneos juegan el papel de andamiaje equivalente al aportado por la glía radial en el estadio embrionario (Bovetti et al., 2007) el problema es que el tejido dañado proporciona las células migrantes un entorno avascular provocado por la lesión hemorrágica.

En tercer y último lugar, la mayoría de las células que provienen del nicho neurogénico sufren apoptosis una vez que han llegado a su destino, el área de lesión. Este fenómeno viene desencadenado por una combinación de la isquemia y la inflamación que colonizan el área lesionada. El número de neuronas que consiguen integrarse en la zona lesionada no es suficiente como para obtener signos de recuperación funcional. En el área lesionada de los animales de este estudio, además de la falta de vascularización en la zona, se han hallado poblaciones de macrófagos que invaden el área de la lesión, produciendo derivados de oxígeno como radicales libres y citoquinas inflamatorias que dañan directamente las células neoformadas a través de vías de señalización que resultan en la activación de caspasas. La función del macrófago tisular así como su morfología depende directamente del tejido en el que se halle. De esta manera la microglía deriva en los macrófagos del Sistema Nervioso central. En este aspecto existen diversos factores de transcripción directamente involucrados en la expresión de genes de diferenciación específicos de linaje. Así, encontramos genes clásicamente asociados al fenotipo de macrófago como la proteína de membrana CD68. Los macrófagos juegan un papel crítico tanto en la respuesta inmunitaria innata como en la adaptativa reconociendo, fagocitando y limpiando el organismo de agentes patógenos y cuerpos apoptóticos. Participan modulando la



respuesta inmunitaria a través de la producción de citoquinas y quimiocinas, la presentación antigénica y la activación y diferenciación de los linfocitos T. Por otro lado también están involucrados en la resolución de la inflamación, promoviendo directamente la reparación de los tejidos dañados. En este contexto son capaces de inducir la síntesis de proteínas de la matriz extracelular, la angiogénesis, la proliferación de fibroblastos circundantes y de fagocitar restos y/o fragmentos celulares (Stout and Suttles, 2004). El macrófago juega un papel importante en la producción de citocinas, radicales libres de oxígeno, proteasas y factores del complemento que, juntamente con los anticuerpos producidos por los linfocitos B podrán opsonizar a dichos patógenos para luego ser reconocidos por los receptores de membrana del macrófago. Por último, el macrófago está también implicado en procesos de eliminación de restos celulares y células apoptóticas. Gracias a los resultados de la inmunohistoquímica con CD68 se ha comprobado como la lesión se rellena de macrófagos a partir de las 72 horas. Estos macrófagos se van eliminando con la evolución de la lesión, sin embargo, a los 28 días de la hemorragia el parénquima lesionado aún presenta este tipo celular. Estas poblaciones de macrófagos que invaden el área de la lesión, mediante la producción de radicales libres y citoquinas, inducen apoptosis en las células neoformadas a partir de la vía de activación de las caspasas.

Como se menciona con anterioridad la combinación de hemorragia, inflamación, el entorno avascular y la presencia de macrófagos induce la muerte por apoptosis en las células neoformadas (Zhang et al., 2006). Al objeto de estudiar los fenómenos de apoptosis en este trabajo se utilizó la técnica de apostain. Esta técnica es un marcador precoz de apoptosis, que permite diferenciar entre este proceso y el proceso de necrosis celular, lo que puede ser problemático con otros marcadores de apoptosis generalmente utilizados. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran como entre los 14 y los 28 días posteriores a la lesión se incrementa el número de células apoptóticas en el parénquima lesionado. Este fenómeno coincide con la desaparición progresiva de células proliferantes que expresan PGFA, Nestina y DCX en el interior de la lesión a partir del día 14 de la inducción del ictus hemorrágico.

Si bien inicialmente la definición de apoptosis se estableció a nivel morfológico se ha ido avanzando en el conocimiento de otros rasgos diferenciales de este tipo de muerte celular. La fragmentación del ADN es el principal fenómeno molecular que, hasta el momento ha podido ser correlacionado claramente con el proceso apoptótico. En la apoptosis el patrón de degradación del ADN es muy ordenado, contrariamente a la degradación aleatoria e irregular del ADN mediada por la liberación de nucleasas y

proteasas que se produce en la necrosis. En dichas neuronas apoptóticas se observa una amplia condensación cromática que precede a la disrupción de la membrana citoplasmática (Edwards et al., 1991). Dicho fenómeno es, aparentemente, la traducción de la degradación endonucleasa del ADN genómico en fragmentos oligonucleosomales de forma regular. En el caso de las neuronas apoptóticas es posible demostrar la presencia de fragmentación oligonucleosomal de ADN pocas horas después de iniciarse la privación neurotrófica (Batistatou and Greene, 1991; Edwards et al., 1991)

La regulación de la apoptosis es objeto de numerosas investigaciones. Disminuir la apoptosis neuronal provocada por una lesión cerebral podría suponer una mejora de los déficits neurológicos consecuentes a este tipo de daños. Uno de los resultados más trascendentes de la investigación que se presenta en este trabajo, es que la administración intracerebral de células madre mesenquimales adultas obtenidas del estroma de la médula ósea ejercen un efecto neuroprotector local, disminuyendo el número de células nerviosas que inician el proceso de apoptosis. En el presente estudio se ha confirmado que en fase aguda existe un importante patrón de apoptosis tras una inducción de hemorragia cerebral. Como resultado del análisis en fase aguda donde se compara el grupo de animales tratados mediante la administración intralesional de células madre mesenquimales respecto al grupo de animales que recibieron sólo suero fisiológico en la zona de lesión se han encontrado evidencias a favor de que las CMMA provocan una disminución de las células apoptóticas del interior de la lesión. Así se demuestra que existe una disminución significativa en el número de células nerviosas que sufren procesos de muerte celular por apoptosis. Estos hallazgos sugieren que existe un efecto neuroprotector de las células madre mesenquimales en una fase precoz tras la terapia celular reduciendo los fenómenos de apoptosis en la neurogénesis secundaria al ictus. Las dos vías de la apoptosis (dependiente e independiente de caspasas) están reguladas por una familia de proteínas que se clasifican en proapoptóticas (Bax, Bcl-xs, Bad, Bid, entre otras) y anti apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL y Mcl-1L) o de pro-supervivencia, según favorezcan o impidan la apoptosis. Además, la apoptosis también se regula a través de las vías de traducción de señales intracelulares, tales como la activación de la vía de la protein-kinasa B (PKB) inducida por factor de crecimiento, que puede inhibir la apoptosis directamente a través de la fosforilación e inactivación de las proteínas Bad (proapoptóticas) y de las caspasas 8 y 9. El efecto local antiapoptótico de las CMMA posiblemente tenga su origen en la regulación de bcl-2/bax, o inhibiendo la expresión de caspasa-3 (Caplan and Dennis, 2006; Tang et al., 2004; Xu et al., 2007). Por otra parte, la observación de que el efecto antiapoptótico de las células madre mesenquimales se inhibe bloqueando la IL-6 (Qu et al., 2007) sugiere

que esta citoquina, liberada por las células madre mesenquimales podría ser uno de los factores más importantes a la hora de explicar su mecanismo citoprotector (Li et al., 2008).

Así mismo algunos estudios han sugerido que los factores tróficos pueden tener un papel en la prevención del daño excitotóxico actuando como “estabilizadores de calcio” endógeno protegiendo así a las neuronas al reducir el flujo de calcio, aumentando la expulsión/tamponamiento o utilizando ambos procesos. La capacidad de las células madre mesenquimales de la médula ósea de generar algunos factores de crecimiento, en particular el NGF y los IGFs, podría ser una explicación para comprender la capacidad de estas células de proteger neuronas neoformadas tras la neurogénesis endógena. Durante el desarrollo embrionario del sistema nervioso de los seres vivos vertebrados, acontece un proceso de muerte celular de grandes dimensiones aparentemente específico del sistema nervioso, que indudablemente constituye un fenómeno muy llamativo y de gran relevancia. En las diferentes áreas del sistema nervioso, tanto periférico como central, aproximadamente la mitad de las neuronas inician una cascada de acontecimientos celulares y moleculares que conllevan la regresión y, en última instancia, la degeneración y muerte neuronal. La magnitud de esta pérdida celular es tal que no puede ser explicada en función de una cierta imprecisión ocasional a nivel genético y/o epigenético.

A lo largo del primer cuarto de este siglo se han realizado estudios que sugieren que el número final de neuronas en los diversos centros nerviosos está determinado por la presencia y el tamaño relativo de la diana de innervación neuronal. Hamburger, en 1934 demostró la existencia de una relación de proporcionalidad entre la cantidad de tejido diana eliminado y la cantidad de muerte neuronal de la población neoformada. Posteriormente se comprobó como en la mayoría de las poblaciones neuronales que experimentan el proceso de muerte neuronal está controlada parcialmente por influencias derivadas de las dianas sinápticas de las neuronas. Así, utilizando estrategias experimentales para aumentar la disponibilidad de tejido diana mediante el trasplante intralesional de CMMA, se consigue reducir de forma significativa la magnitud del proceso de muerte neuronal fisiológica y por consiguiente, un aumento en el número de neuronas supervivientes al finalizar dicho proceso. A la vista de todas estas observaciones resulta lógico concluir que, durante el periodo de muerte celular, la supervivencia de las células neoformadas está condicionada en gran medida por el aporte de un trofismo asociado al tejido dañado. Al iniciarse el proceso de muerte neuronal aquellas neuronas en exceso que no consiguen cantidades suficientes inician

un proceso de degeneración que les lleva a la muerte. Estas cantidades de factores tróficos nunca serán suficientes para mantener la supervivencia de las células neoformadas si el tejido diana de estas células es una lesión hemorrágica vacía de células que puedan expresarlos.

Durante el desarrollo embrionario las neuronas pasan por tres etapas diferentes en relación con sus requerimientos tróficos:

- Una primera, previa al periodo de muerte celular en la que las neuronas pueden sobrevivir sin estar en contacto con el tejido de destino.
- Una segunda, en la que el contacto con el tejido diana es indispensable para la supervivencia de las neuronas, en función del aporte trófico que éste les proporciona. De hecho, la muerte neuronal no refleja el fracaso de las neuronas para conseguir llegar hasta el área diana sino su incapacidad para alcanzar cantidades suficientes del aporte trófico suministrado por el tejido diana.
- Una tercera y última, en la que las neuronas maduran y reducen progresivamente su dependencia de las interacciones con el tejido diana.

Aplicando estos conocimientos al presente estudio, nos lleva a la conclusión de que ésta es una de las razones por la que las células procedentes de la neurogénesis endógena potenciada por la hemorragia cerebral no colonizan la zona de lesión y mueren por apoptosis. Sin embargo este fenómeno ocurre en menor medida en los cerebros lesionados que han recibido una inyección intralesional de CMMA porque las células neoformadas que proceden de la ZSV al mantener contacto con las CMMA en el interior de la lesión no derivan hacia la muerte neuronal. Además las CMMA que sobreviven envían factores tróficos a las células de la ZSV para favorecer su supervivencia.

Por lo tanto, estos hallazgos sugieren que existe un efecto neuroprotector de las células madre mesenquimales en una fase precoz tras la terapia celular reduciendo los fenómenos de apoptosis en la neurogénesis endógena activada tras una lesión hemorrágica. Este efecto beneficioso se puede añadir a un posible efecto neurotrófico directo, condicionante de neurogénesis en el tejido huésped. En este trabajo se han realizado estudios en fase aguda de la lesión a lo largo de distintos momentos evolutivos (24, 48, 72 horas, 7, 14, 21, 28 días) del trasplante de células madre mesenquimales adultas como tratamiento para la HIC. El principal objetivo del presente estudio en fase aguda ha sido conocer la evolución del comportamiento y la integración

de las CMMA administradas intracerebralmente. Los resultados muestran como los animales trasplantados presentan un número mayor de células KI-67, Nestina y Doblecortina positivas tanto en la zona subventricular como en el área de lesión que los animales que sólo han sido lesionados.

La actividad proliferativa de las células precursoras tiene su máximo de actividad entre las 48 horas y las 72 horas de la hemorragia y el trasplante en la ZSV, estas células con capacidad proliferativa se desplazan hacia el núcleo estriado aproximadamente hacia el día 7 posterior a la lesión y el trasplante. Estas células proliferativas mantienen su actividad a lo largo de todo el estudio, fenómeno que no ocurre en los animales sometidos únicamente a una HIC en los que la proliferación celular se reduce en un 80% a los 28 días. Además, cuando los grupos de animales trasplantados con CMMA fueron estudiados, se encontró una fuerte positividad en el estudio de las proteínas de Nestina y Doblecortina en la ZSV en las primeras etapas tras el trasplante (48 y 72 horas) y en la zona de la lesión desde el día 7 posterior al trasplante hasta al menos el día 28 después de la hemorragia.

Este hallazgo sugiere que la administración intracerebral de CMMA permite la supervivencia de un mayor número de células progenitoras que provienen de la neurogénesis endógena en el estriado lesionado hasta al menos 28 días después del trasplante.

A las dos semanas del estudio hay un punto de inflexión al comparar los animales trasplantados con los animales únicamente lesionados. Pasados 14 días de la lesión cerebral en los animales sometidos a una HIC, la mayoría de la proliferación de células comienzan a sufrir apoptosis. Sin embargo, a partir de dos semanas tras el trasplante, la cantidad de células apoptóticas de los animales trasplantados con CMMA significativamente mas baja el grupo anterior. Estos datos podrían sugerir que a partir de la segunda semana del trasplante de CMMA éstas están perfectamente integradas en el tejido lesionado y neuroprotegen a algunas células de sufrir apoptosis.

Gracias a los resultados obtenidos en los estudios de terapia celular en fase aguda de una lesión hemorrágica se ha demostrado las características biológicas y la capacidad de neuroprotección y potenciación de la neurogénesis endógena que poseen las células madre mesenquimales de la médula ósea. Es bien sabido que en el transcurso de los primeros días después de un accidente cerebrovascular hemorrágico, el paciente podría ser inestable y una cirugía adicional podría ser perjudicial. Sin embargo, dos meses después de HIC el paciente está estable. En estas circunstancias,

sería posible la administración local de CMMA autólogas. Así, la estrategia terapéutica verdaderamente útil de terapia celular en este tipo de lesiones es el trasplante de CMMA en una situación crónica, cuando las secuelas neurológicas están completamente establecidas después de un accidente cerebrovascular hemorrágico. Al llevar a cabo el estudio de la administración intralesional de CMMA en fase crónica, uno de los resultados más relevantes que se han obtenido en ese estudio es que después de la inducción experimental de una hemorragia intracerebral en animales, aparece una disfunción neurológica significativa y mantenida, sin embargo, pocos meses después de la hemorragia intracerebral crónica, una administración intralesional de CMMA alogénicas inicia una recuperación funcional notable. Esta recuperación es claramente significativa en comparación con los animales controles a los tres meses después del tratamiento y continúa al menos 6 meses después del trasplante.

Parece evidente el beneficio funcional que se confieren las CMMA trasplantadas tras una lesión cerebral, sin embargo, el mecanismo de acción de dichas células no es aún del todo conocido. Uno de los mecanismos por el cual las CMMA propician la mejora funcional de los animales es la sustitución o el incremento de los circuitos neuronales derivados de la integración de las células trasplantadas en el tejido lesionado. Los resultados de este trabajo muestran gracias a la hibridación *in situ*, cómo las CMMA trasplantadas son capaces de diferenciarse hacia estirpes de origen neural expresando fenotipos tanto neuronales como gliales y sobreviven al menos 6 meses después de ser trasplantadas. Las neuronas derivadas de CMMA son capaces de integrarse en el tejido formando nuevas sinapsis funcionales tanto *in vitro* como *in vivo* (Vaquero et al., 2006; Vaquero and Zurita, 2011; Zurita et al., 2007; Zurita et al., 2008a; Zurita and Vaquero, 2006).

Desafortunadamente el porcentaje de células del trasplante que se localiza en el cerebro receptor mediante hibridación *in situ* es muy bajo en comparación con el número de CMMA trasplantadas. Hoy en día se sabe que el trasplante de CMMA puede reparar el daño cerebral, pero la regeneración de tejidos está limitada por la muerte de las células trasplantadas. La mayoría de los procesos de degeneración celular tras el trasplante se produce en los primeros días. La vía predominante de muerte celular en el trasplante es la apoptosis, las células se encuentran en un camino hacia la muerte activado por una combinación de factores adversos propiciados por la isquemia y la inflamación. La zona lesión cerebral proporciona a las células trasplantadas un ambiente avascular mantenido hasta que la angiogénesis ofrezca una vasculatura que aporte oxígeno y alimento a las células trasplantadas. Además, las células se

encuentran sometidas a un ambiente privado de oxígeno, con abundancia de citoquinas inflamatorias que no sólo pueden dañar directamente a las células a través de la membrana celular sino que pueden iniciar vías de señalización que resultan de la activación de las caspasas. Además, en los primeros días posteriores a la hemorragia, la población de macrófagos invade el área de trasplante (Dirnagl et al., 1999). La prestación eficiente de células viables en la zona hemorrágica es un requisito indispensable para repoblar el cerebro y mejoran aún más el déficit funcional de los animales.

La mejora funcional observada en nuestro experimento en fase crónica no puede explicarse únicamente por la integración funcional neuronal. Curiosamente, los efectos de CMMA no se limitan a su integración en el tejido dañado, sino también a la potenciación de la neurogénesis endógena que como se ha indicado anteriormente, ocurre habitualmente después de una hemorragia intracerebral. Los animales trasplantados con CMMA 2 meses después de la hemorragia cerebral muestran un rendimiento más elevado en el número de células KI-67, Nestina y Doblecortina positivas a los 6 meses de evolución del trasplante que los animales que únicamente recibieron un tratamiento de suero salino.

Los estudios explicados anteriormente demuestran que uno de los principales papeles del trasplante de CMMA en este tipo de modelos experimentales es proteger a los progenitores neurales en migración evitando que entren en apoptosis al llegar a la zona de lesión. Los animales trasplantados muestran un número mayor de células que expresan KI-67, Nestina y Doblecortina que los animales controles. Estas células migran a la zona de lesión. 6 meses después del trasplante. Las células neoformadas son capaces de expresar fenotipo de neurona inmadura (B-III tubulina). Estos estudios demuestran el papel de las CMMA trasplantadas en la neuroprotección de las células neoformadas procedentes de la activación de la neurogénesis endógena.

Además, el mecanismo subyacente de la administración intracerebral de células madre mesenquimales para acelerar la recuperación de la función neurológica secundaria al ictus hemorrágico podría atribuirse a su capacidad de inhibir la inflamación y promover la angiogénesis.

En estudios previos de este laboratorio se muestra como las CMMA trasplantadas en otro tipo de lesión del Sistema Nervioso se diferencian tanto hacia una estirpe endotelial como hacia células que forman parte de las paredes de los vasos sanguíneos a los tres meses del trasplante. Estos hallazgos sugieren una diferenciación de las

CMMA trasplantadas hacia células musculares lisas y a células endoteliales, formando estructuras vasculares y contribuyendo a la formación de un lecho vascular en el tejido huésped, y por tanto a la angiogénesis y vasculogénesis del área previamente lesionada. Este hallazgo apoya las observaciones previas a favor de que el trasplante de CMMA trata de reconstruir anatómicamente la zona lesionada (Vaquero et al., 2008). En estudios realizados por diversos autores, se ha discutido si las células madre mesenquimales son capaces de transformarse in vivo en células endoteliales, existiendo evidencias a favor de esta posibilidad, en presencia de factores de angiogénesis, tales como el VEGF (Ball et al., 2007), cuya expresión se ha visto aumentada en los resultados de este estudio a lo largo de la evolución de la lesión. Por otra parte, es bien conocido la capacidad de las células madre mesenquimales de adquirir in vitro características de células endoteliales cuando son cultivadas en medio suplementados con VEGF o en presencia de hipoxia (Oswald et al., 2004)

Como conclusión de estos resultados y de acuerdo con informes anteriores de la experimentación en HIC aguda, el trasplante intralesional de CMMA presenta un efecto sinérgico sobre el tejido lesionado. En primer lugar, después del trasplante alogénico de CMMA, las células del donante se integran en el tejido cerebral mostrando evidencias morfológicas de la expresión de marcadores como PGFA y NeuN. En segundo lugar, el trasplante local de células mesenquimales adultas potencia la neurogénesis endógena que existe habitualmente después de una hemorragia intracerebral, ejerciendo además un efecto neuroprotector sobre las células progenitoras recién formadas. En tercer lugar, el papel de las células estromales es inhibir la inflamación y promover la angiogénesis. Estos mecanismos pueden contribuir a compensar la pérdida de tejido nervioso y podrían dar una explicación a los procesos de mejora de la función neurológica.

A pesar de las características terapéuticas anteriormente mencionadas que presentan las células madre mesenquimales, ninguno de los estudios de terapia celular ha restaurado por completo la función motora y sensorial que se pierde como consecuencia a una hemorragia cerebral. Este fracaso de la terapia celular podría tener su origen en que en los primeros días tras el trasplante se produce una elevadísima muerte de las células trasplantadas promovida por la presencia de isquemia e inflamación presente en la lesión cerebral. Como se ha indicado previamente, el tejido dañado en el cerebro proporciona a las células injertadas un entorno avascular que se mantiene hasta que la angiogénesis ofrece una vasculatura. Además, en los primeros días después de la hemorragia, las poblaciones de macrófagos invaden el área de la lesión, la producción de radicales libres y citoquinas inflamatorias que pueden dañar



directamente las células del injerto a través de daño de la membrana celular e también iniciar las vías de señalización que resultan en la activación de caspasas. Tras los estudios de este trabajo queda claro el beneficio funcional que se confiere a las CMMA trasplantadas. Sin embargo, para llevar a cabo todas estas funciones las CMMA deben permanecer vivas. La prestación eficiente de células viables en la zona hemorrágica es un requisito importantísimo para repoblar el cerebro lesionado y mejorar así aún más los déficits funcionales de los animales. Por esta razón, el último estudio de este trabajo se centró en la utilización de un soporte celular que permitiendo la integración y la migración de las CMMA aumentando así la supervivencia celular y, en consecuencia, mejorando los déficits neurológicos.

Así, en el presente estudio, se ha diseñado una estrategia experimental de mejora de la terapia celular que podría aplicarse a los pacientes en fase crónica, en la que el trasplante de las CMMA se realiza insertado en una matriz de plasma rico en plaquetas que podría derivar en el aumento de la viabilidad y actividad biológica de las células estromales de la médula ósea disminuyendo así las secuelas neurológicas establecidas después del accidente cerebrovascular hemorrágico.

El PRP fue utilizado con éxito en 1970 por Matras para aplicaciones tales como un injerto de piel en ratones. Desde entonces, numerosos estudios han demostrado que el PRP produce efectos beneficiosos en la reparación de úlceras en la piel. En la actualidad el PRP se obtiene de la sangre mediante diversas técnicas de separación de los componentes sanguíneos (Matras et al, 1970). Además de una mezcla de PRP, cloruro de calcio y trombina se puede obtener un gel cuyo interior microscópico adopta una forma de malla que aporta unas condiciones ideales para albergar las CMMA en su interior. El gel obtenido es una concentración de plaquetas en suspensión en un pequeño volumen de plasma que actúa como un portador de factores de crecimiento, que son secretados activamente por las plaquetas (Facchiano et al., 2002; Novikova et al., 2006). Por otra parte, PRP es rico en proteínas, como el fibrinógeno, que en presencia de cloruro cálcico y trombina desencadena un proceso enzimático en el que el fibrinógeno experimenta un cambio estructural convirtiéndose en fibrina. Una vez realizado el cambio molecular se vuelve insoluble y con capacidad de polimerizar y de entrelazarse con otras moléculas iguales, para formar enormes agregados macromoleculares construyendo así una red tridimensional. El gel inyectado en el interior de la lesión, atrapa eventualmente entre sus fibras a las CMMA, permitiendo su adhesión, proliferación, migración y diferenciación hacia elementos del sistema nervioso

central. Este gel por tanto, actúa como una matriz extracelular artificial que sustituye a la que se pierde como consecuencia de la lesión cerebral.

La principal ventaja es utilizar un material autólogo, es que se evita la toxicidad o la respuesta inmune del organismo hacia el propio Material. Dada la creciente aparición de estrategias de terapia celular para la lesión del sistema nervioso (Vaquero et al., 2006; Zurita et al., 2001; Zurita et al., 2008b; Zurita and Vaquero, 2006) el objetivo de este estudio es comparar la utilización de un soporte derivado de PRP a la solución salina como matriz en los trasplantes de CMMA, con el propósito de conocer cuál de estos dos vectores utilizados para la administración de las células ofrece las condiciones mas optimas para una mejora de la viabilidad y actividad biológica de las células estromales de médula ósea y promover así de su diferenciación hacia elementos del sistema nervioso (Zurita et al., 2010).

Los resultados del estudio realizados sobre este modelo experimental demostraron que el trasplante de CMMA en un gel derivado de PRP mejora significativamente el número de células de la médula ósea capaces de integrarse en el cerebro de la hembra receptora diferenciándose a varios tipos celulares de la estirpe neural tanto células de glía como neuronas en comparación con los animales que recibieron el trasplante del mismo número de CMMA disueltas en suero salino. Asimismo, en los cerebros lesionados de los animales sometidos a una administración de CMMA en gel de PRP se observó un incremento de la actividad proliferativa de los precursores neurales, y de la expresión de antígenos característicos de diferenciación neuronal y glial, en comparación con los cerebros adultos de los animales que recibieron una inyección intracerebral de CMMA en suero salino. Estos resultados podrían deberse a que la utilización del gel ofrece mejores condiciones para el aumento de la viabilidad y actividad biológica de las células estromales de la médula ósea. Queda demostrado así, que la administración de las CMMA en el núcleo hemorrágico es más eficaz si las células se inyectan en un gel derivado de PRP. Esta mayor efectividad presentada por la terapia celular con un gel derivado de PRP como soporte celular se relaciona con varias explicaciones; en primer lugar la composición tridimensional aporta propiedades mecánicas al tejido que las CMMA tratan de restaurar. Este entramado además mantiene la forma celular. Una propiedad que caracteriza a las CMMA es que son células adherentes, así la utilización del gel permite la adhesión de célula-célula así como la unión de las células al gel para iniciar la formación del tejido, permitiendo así la comunicación intercelular. Así mismo, la estructura tridimensional forma sendas por las células con capacidad de migrar y diferenciarse. El gel tridimensional actúa como

primordio del nuevo tejido y de vehículo del reclutamiento celular y vascular. Esta estructura tridimensional será substituida progresivamente por matriz extracelular propia del tejido que se forme a partir de las CMMA trasplantadas, que es producido a partir de la diferenciación e integración celular.

Las propiedades físicas del soporte, es decir, su consistencia, la disposición de las fibras, el tamaño de los espacios entre las fibras, etc, dependen de la composición del gel. La cantidad de trombina y cloruro cálcico determina la consistencia de esta estructura. Estudios previos en el laboratorio determinaron la concentración mas optima para la supervivencia celular (Zurita et al., 2010).

En segundo lugar, las plaquetas, tras su activación, liberan proteínas llamadas citocinas, que se comportan como señalizadoras y regulan procesos celulares clave como la diferenciación, la mitogénesis y la quimiotaxis reciben el nombre de factores de crecimiento.

Los factores de crecimiento hasta el momento más conocidos en estructura y función son el PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), potente regulador que estimula la replicación celular progenitora y la proliferación de las células endoteliales y el TGF- $\beta$  (transforming-Derived Growth Factor), potente factor de proliferación y diferenciación del tejido conectivo, implicado en la formación de la matriz extracelular, la osteogénesis y condrogénesis. Además se le atribuye un potente efecto antiinflamatorio. Los gránulos de las plaquetas también contienen quimoquinas mediadoras de la inflamación y actúan señalizando el lugar de la lesión a leucocitos, siendo responsables indirectos de los mecanismos de regeneración tisular.

El término factores de crecimiento en si mismo suele fomentar el equívoco. Son citocinas que ciertamente pueden inducir la mitosis, pero también la diferenciación celular, la secreción de matriz extracelular, la quimiotaxis, la inhibición de una función o incluso la apoptosis. Además el mismo factor de crecimiento puede tener diversos efectos, a veces contrapuestos, dentro del mismo proceso biológico. El PRP, además de factores como son PDGF, TGF-b, EGF, IGF-1, VEGF, bFGF, FGF-2 o HGF, también contiene una gran cantidad de otros elementos tanto intra como extraplaquetarios con gran potencial biológico que deben valorarse para obtener conclusiones correctas: factores de coagulación, factores fibrinolíticos, proteasas y antiproteasas, albúmina, inmunoglobulinas, fibrinógeno, histamina, serotonina, catecolaminas, iones de calcio, ATP, trombocidina, osteonectina, osteocalcina, chemokinas, condritin 4-sulfato.

Los lisosomas de las plaquetas contienen una gran cantidad de enzimas proteolíticas, sus gránulos densos contienen factores protrombóticos y sus gránulos alfa presentan un cóctel de mediadores químicos entre los que destacan el PDGF y el TGF- $\beta$ . Además, la presencia del TGF- $\beta$  en estado latente bloquea la respuesta inflamatoria inhibidora de la regeneración que es mediada por linfocitos. Durante el tiempo de su formación, las plaquetas tienen la propiedad de acumular por endocitosis numerosas moléculas del medio entre las que destacan mediadores lipídicos. Estudios recientes sugieren que la esfingosina-1-fosfato, el ácido fosfatídico y el lisofosfatidato, con efecto antiapoptótico de las células endoteliales, están implicados en la quimiotaxis de células endoteliales, su proliferación y promoción de uniones adherentes para formar estructuras tipo capilar. La esfingosina parece fundamental en el inicio de la angiogénesis, dado que es el ligando de los receptores EDG (endothelial differentiation genes). Finalmente, la sobreexpresión de VEGFR2, hace sensible al endotelio circundante a la producción del VEGF para iniciar la angiogénesis a partir de las células endoteliales (Romagnani et al., 2004).

En este sentido juegan un importante papel la acción de factores como TGF- $\beta$ , bFGF, EGF, HGF y el IGF-1 (Engert et al., 1996). A continuación, coexistiendo con el proceso de la fibrinólisis y la activación endotelial, se produce la liberación in situ de factores de crecimiento secretados por los gránulos  $\alpha$  plaquetarios que quedan secuestrados en el interior de la malla tridimensional. La angiogénesis va a ser el motor de la regeneración desde el inicio ya que posibilita tanto la integración de las CMMA trasplantadas como la llegada de los progenitores neurales procedentes de la activación de la neurogénesis endógena. Esta respuesta coordinada a escala local y sistémica producirá un nuevo árbol vascular en la zona dañada gobernando la formación del nuevo tejido.

Aunque el mecanismo de acción no está claro, muchos datos indican que los factores tróficos liberados por las plaquetas, junto con las señales microambientales que las células estromales mesenquimales migran, se dividen y aumentan la síntesis de matriz extracelular. Estos factores son fundamentales para el estímulo y la regulación de algunos procesos y desempeñan un papel crucial en los procesos de quimiotaxis, diferenciación y metabolismo. Este hallazgo, y la presencia de factores de crecimiento liberados por las plaquetas, no sólo facilitan enormemente su integración y la supervivencia celular, sino también su relación con la migración y las señales químicas del medio ambiente.

Basándose en estas observaciones, es lógico pensar que el uso de geles derivados de PRP ofrece una gran promesa para el desarrollo de estrategias novedosas y eficaces en la terapia celular con CMMA en los animales que sufren HIC.

Tras realizar este trabajo se puede concluir que la administración experimental de una suspensión de células madre mesenquimales obtenidas del estroma de la médula ósea, se asocia a una progresiva recuperación funcional al menos en el curso de 6 meses de evolución tras el trasplante. Esta mejora funcional ocurre gracias a un efecto sinérgico de las células madre, por un lado, estas células se integran en el tejido diferenciándose a neuronas y células de glía intentando sustituir la pérdida de células que ocurre a causa de la HIC. Por otro lado, las CMMA mediante la liberación de factores tróficos ejercen ante el cerebro un efecto neuroprotector y neuroregenerador, activando la neurogénesis endógena y evitando que los neuroblastos sufran fenómenos de apoptosis. Estos mecanismos pueden contribuir a compensar la pérdida de tejido nervioso y la función neurológica. Así mismo la utilización de un gel derivado de PRP potencia la supervivencia celular y de este modo los efectos terapéuticos que las CMMA ejercen sobre el tejido lesionado tras una HIC.

En los últimos años existe un interés creciente acerca del potencial terapéutico de las células madre adultas. Por tanto, a la vista de nuestros resultados, cabe plantearse que la terapia celular aplicada a la clínica humana podría ser un tratamiento efectivo para paliar las secuelas secundarias, hasta ahora incurables, de un ictus hemorrágico. La investigación en este área permitirá identificar los aspectos claves para hacer de la terapia celular una técnica segura y eficaz que constituya un avance sin precedentes en el campo de la medicina.

## **VII. CONCLUSIONES**

## VII. Conclusiones

---

En este trabajo se ha estudiado la efectividad de la terapia celular con células madre mesenquimales obtenidas de la médula ósea como tratamiento para la hemorragia intracerebral en rata obteniéndose las siguientes conclusiones:

1. Los animales sometidos a terapia celular experimentan una recuperación motora y sensorial notablemente superior a la de los grupos controles. Esta recuperación parece ser progresiva al menos en el curso de 6 meses tras el trasplante.

2. Las células madre mesenquimales adultas producen un efecto sinérgico una vez trasplantadas en el tejido lesionado:

2.1. En primer lugar, estas células ejercen en el cerebro lesionado un efecto neuroprotector y neuro-regenerador, activando la neurogénesis endógena y evitando que los neuroblastos recién formados sufran fenómenos de apoptosis.

2.2. Por otra parte, las células madre mesenquimales son capaces de integrarse en el cerebro huésped diferenciándose hacia distintas estirpes celulares del Sistema Nervioso, tanto a neuronas como a células gliales.

3. La utilización de un gel derivado de plasma rico en plaquetas como soporte para el trasplante de células madre adultas favorece la supervivencia celular tras el trasplante, potenciando así los efectos terapéuticos de las células en el tejido lesionado y mejorando como consecuencia la recuperación de los déficits neurológicos secundarios a la lesión.

4. En los últimos años existe un interés creciente acerca del potencial terapéutico de las células madre adultas. Estas técnicas de terapia celular abren puertas de esperanza a pacientes que sobreviven tras una hemorragia intracerebral y permanecen con graves e invalidantes secuelas.

## **VIII. BIBLIOGRAFÍA**



## VIII. Bibliografía

---

1. Aggarwal, S.; Pittenger, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005 Feb;105(4):1815-1822.
2. Aguilar-Rebolledo, F.; Mateos-Gomez, J. H. [Transposition and transplant of epiploon to the brain and spinal cord. Experimental investigation. Current knowledge and perspectives for clinical application]. *Gac Med Mex*. 1989 Nov;125(11-12):325-329.
3. Alison, M. R.; Poulson, R.; Forbes, S.; Wright, N. A. An introduction to stem cells. *J Pathol*. 2002 Jul;197(4):419-423.
4. ALTMAN, J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol*. 1969 Dec;137(4):433-457.
5. ALTMAN, J.; CHOROVER, S. L. AUTORADIOGRAPHIC INVESTIGATION OF THE DISTRIBUTION AND UTILIZATION OF INTRAVENTRICULARLY INJECTED ADENINE-3H, URACIL-3H AND THYMIDINE-3H IN THE BRAINS OF CATS. *J Physiol*. 1963 Dec;169:770-779.
6. ALTMAN, J.; Das, G. D. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol*. 1965 Jun;124(3):319-335.
7. Alvarez-Buylla, A.; Garcia-Verdugo, J. M. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci*. 2002 Feb;22(3):629-634.
8. Andres, R. H.; Guzman, R.; Ducray, A. D.; Mordasini, P.; Gera, A.; Barth, A.; Widmer, H. R.; Steinberg, G. K. Cell replacement therapy for intracerebral hemorrhage. *Neurosurg Focus*. 2008;24(3-4):E16.
9. Anitua, E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999 Jul;14(4):529-535.
10. Arias-Carrion, O.; Drucker-Colin, R. [Neurogenesis as a therapeutic strategy to regenerate central nervous system]. *Rev Neurol*. 2007 Dec;45(12):739-745.
11. Ariesen, M. J.; Claus, S. P.; Rinkel, G. J.; Algra, A. Risk factors for intracerebral hemorrhage in the general population: a systematic review. *Stroke*. 2003 Aug;34(8):2060-2065.
12. Artavanis-Tsakonas, S.; Matsuno, K.; Fortini, M. E. Notch signaling. *Science*. 1995 Apr;268(5208):225-232.
13. Artavanis-Tsakonas, S.; Rand, M. D.; Lake, R. J. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*. 1999 Apr;284(5415):770-776.

14. Baksh, D.; Song, L.; Tuan, R. S. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med.* 2004 Jul;8(3):301-316.
15. Ball, S. G.; Shuttleworth, C. A.; Kielty, C. M. Vascular endothelial growth factor can signal through platelet-derived growth factor receptors. *J Cell Biol.* 2007 May;177(3):489-500.
16. Banasr, M.; Hery, M.; Printemps, R.; Daszuta, A. Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone. *Neuropsychopharmacology.* 2004 Mar;29(3):450-460.
17. Barry, F. P.; Murphy, J. M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004 Apr;36(4):568-584.
18. Batistatou, A.; Greene, L. A. Aurintricarboxylic acid rescues PC12 cells and sympathetic neurons from cell death caused by nerve growth factor deprivation: correlation with suppression of endonuclease activity. *J Cell Biol.* 1991 Oct;115(2):461-471.
19. Bianchi, G.; Muraglia, A.; Daga, A.; Corte, G.; Cancedda, R.; Quarto, R. Microenvironment and stem properties of bone marrow-derived mesenchymal cells. *Wound Repair Regen.* 2001 Nov;9(6):460-466.
20. Bieback, K.; Kern, S.; Kluter, H.; Eichler, H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells.* 2004;22(4):625-634.
21. Bissell, M. J.; Radisky, D. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer.* 2001 Oct;1(1):46-54.
22. Bovetti, S.; Hsieh, Y. C.; Bovolín, P.; Perroteau, I.; Kazunori, T.; Puche, A. C. Blood vessels form a scaffold for neuroblast migration in the adult olfactory bulb. *J Neurosci.* 2007 May;27(22):5976-5980.
23. Broderick, J.; Brott, T.; Tomsick, T.; Tew, J.; Duldner, J.; Huster, G. Management of intracerebral hemorrhage in a large metropolitan population. *Neurosurgery.* 1994 May;34(5):882-887.
24. Brown, J. P.; Couillard-Despres, S.; Cooper-Kuhn, C. M.; Winkler, J.; Aigner, L.; Kuhn, H. G. Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol.* 2003 Dec;467(1):1-10.
25. Caplan, A. I.; Dennis, J. E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem.* 2006 Aug;98(5):1076-1084.
26. Cardenas, A.; Moro, M. A.; Hurtado, O.; Leza, J. C.; Lizasoain, I. Dual role of nitric oxide in adult neurogenesis. *Brain Res Brain Res Rev.* 2005 Dec;50(1):1-6.
27. Carleton, A.; Petreanu, L. T.; Lansford, R.; Alvarez-Buylla, A.; Lledo, P. M. Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nat Neurosci.* 2003 May;6(5):507-518.

28. Castellanos, M.; Leira, R.; Serena, J.; Blanco, M.; Pedraza, S.; Castillo, J.; Davalos, A. Plasma cellular-fibronectin concentration predicts hemorrhagic transformation after thrombolytic therapy in acute ischemic stroke. *Stroke*. 2004 Jul;35(7):1671-1676.
29. Cerdan, C.; Rouleau, A.; Bhatia, M. VEGF-A165 augments erythropoietic development from human embryonic stem cells. *Blood*. 2004 Apr;103(7):2504-2512.
30. Chang, Y. J.; Tseng, C. P.; Hsu, L. F.; Hsieh, T. B.; Hwang, S. M. Characterization of two populations of mesenchymal progenitor cells in umbilical cord blood. *Cell Biol Int*. 2006 Jun;30(6):495-499.
31. Charriaut-Marlangue, C.; Margaill, I.; Represa, A.; Popovici, T.; Plotkine, M.; Ben-Ari, Y. Apoptosis and necrosis after reversible focal ischemia: an in situ DNA fragmentation analysis. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1996 Mar;16(2):186-194.
32. Che, X.; Ye, W.; Panga, L.; Wu, D. C.; Yang, G. Y. Monocyte chemoattractant protein-1 expressed in neurons and astrocytes during focal ischemia in mice. *Brain Res*. 2001 Jun;902(2):171-177.
33. Chenn, A.; Walsh, C. A. Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. *Science*. 2002 Jul;297(5580):365-369.
34. Chirumamilla, S.; Sun, D.; Bullock, M. R.; Colello, R. J. Traumatic brain injury induced cell proliferation in the adult mammalian central nervous system. *J Neurotrauma*. 2002 Jun;19(6):693-703.
35. Cifu, D. X.; Stewart, D. G. Factors affecting functional outcome after stroke: a critical review of rehabilitation interventions. *Arch Phys Med Rehabil*. 1999 May;80(5 Suppl 1):S35-S39.
36. Clark, A. W.; Krekoski, C. A.; Bou, S. S.; Chapman, K. R.; Edwards, D. R. Increased gelatinase A (MMP-2) and gelatinase B (MMP-9) activities in human brain after focal ischemia. *Neurosci Lett*. 1997 Nov;238(1-2):53-56.
37. Conover, J. C.; Allen, R. L. The subventricular zone: new molecular and cellular developments. *Cell Mol Life Sci*. 2002 Dec;59(12):2128-2135.
38. Corotto, F. S.; Henegar, J. A.; Maruniak, J. A. Neurogenesis persists in the subependymal layer of the adult mouse brain. *Neurosci Lett*. 1993 Jan;149(2):111-114.
39. Coskun, V.; Luskin, M. B. Intrinsic and extrinsic regulation of the proliferation and differentiation of cells in the rodent rostral migratory stream. *J Neurosci Res*. 2002 Sep;69(6):795-802.
40. Couillard-Despres, S.; Winkler, J.; Uyanik, G.; Aigner, L. Molecular mechanisms of neuronal migration disorders, quo vadis? *Curr Mol Med*. 2001 Dec;1(6):677-688.
41. del Zoppo, G. J.; Schmid-Schonbein, G. W.; Mori, E.; Copeland, B. R.; Chang, C. M. Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. *Stroke*. 1991 Oct;22(10):1276-1283.

42. Delgado, P.; Alvarez, Sabin J.; Montaner, J. [Biological markers in spontaneous intracerebral hemorrhage]. *Neurologia*. 2007 Sep;22(7):448-455.
43. des, Portes, V; Francis, F.; Pinard, J. M.; Desguerre, I.; Moutard, M. L.; Snoeck, I.; Meiners, L. C.; Capron, F.; Cusmai, R.; Ricci, S.; Motte, J.; Echenne, B.; Ponsot, G.; Dulac, O.; Chelly, J.; Beldjord, C. doublecortin is the major gene causing X-linked subcortical laminar heterotopia (SCLH). *Hum Mol Genet*. 1998 Jul;7(7):1063-1070.
44. Dirnagl, U.; Iadecola, C.; Moskowitz, M. A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*. 1999 Sep;22(9):391-397.
45. Doetsch, F.; Caille, I.; Lim, D. A.; Garcia-Verdugo, J. M.; Alvarez-Buylla, A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*. 1999 Jun;97(6):703-716.
46. Doetsch, F.; Garcia-Verdugo, J. M.; Alvarez-Buylla, A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci*. 1997 Jul;17(13):5046-5061.
47. Doetsch, F.; Petreanu, L.; Caille, I.; Garcia-Verdugo, J. M.; Alvarez-Buylla, A. EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron*. 2002 Dec;36(6):1021-1034.
48. Dong, Y.; Benveniste, E. N. Immune function of astrocytes. *Glia*. 2001 Nov;36(2):180-190.
49. Donovan, P. J.; Gearhart, J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature*. 2001 Nov;414(6859):92-97.
50. Edwards, S. N.; Buckmaster, A. E.; Tolkovsky, A. M. The death programme in cultured sympathetic neurones can be suppressed at the posttranslational level by nerve growth factor, cyclic AMP, and depolarization. *J Neurochem*. 1991 Dec;57(6):2140-2143.
51. Emsley, J. G.; Hagg, T. alpha6beta1 integrin directs migration of neuronal precursors in adult mouse forebrain. *Exp Neurol*. 2003 Oct;183(2):273-285.
52. Engert, J. C.; Berglund, E. B.; Rosenthal, N. Proliferation precedes differentiation in IGF-I-stimulated myogenesis. *J Cell Biol*. 1996 Oct;135(2):431-440.
53. Eriksson, P. S.; Perfilieva, E.; Bjork-Eriksson, T.; Alborn, A. M.; Nordborg, C.; Peterson, D. A.; Gage, F. H. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*. 1998 Nov;4(11):1313-1317.
54. Facchiano, F.; Lentini, A.; Fogliano, V.; Mancarella, S.; Rossi, C.; Facchiano, A.; Capogrossi, M. C. Sugar-induced modification of fibroblast growth factor 2 reduces its angiogenic activity in vivo. *Am J Pathol*. 2002 Aug;161(2):531-541.
55. Ferro, J. M. Update on intracerebral haemorrhage. *J Neurol*. 2006 Aug;253(8):985-999.

56. Forbes, S. J.; Vig, P.; Poulsom, R.; Alison, M. R.; Wright, N. A. Bone marrow-derived liver stem cells: their therapeutic potential. *Gastroenterology*. 2002 Aug;123(2):654-655.
57. Francis, F.; Koulakoff, A.; Boucher, D.; Chafey, P.; Schaar, B.; Vinet, M. C.; Friocourt, G.; McDonnell, N.; Reiner, O.; Kahn, A.; McConnell, S. K.; Berwald-Netter, Y.; Denoulet, P.; Chelly, J. Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron*. 1999 Jun;23(2):247-256.
58. Friedenstein, A. J.; Deriglasova, U. F.; Kulagina, N. N.; Panasuk, A. F.; Rudakowa, S. F.; Luria, E. A.; Ruadkow, I. A. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol*. 1974;2(2):83-92.
59. Friedenstein, A. J.; Gorskaja, J. F.; Kulagina, N. N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*. 1976 Sep;4(5):267-274.
60. Garcia-Verdugo, J. M.; Doetsch, F.; Wichterle, H.; Lim, D. A.; Alvarez-Buylla, A. Architecture and cell types of the adult subventricular zone: in search of the stem cells. *J Neurobiol*. 1998 Aug;36(2):234-248.
61. Gebel, J. M.; Brott, T. G.; Sila, C. A.; Tomsick, T. A.; Jauch, E.; Salisbury, S.; Khoury, J.; Miller, R.; Pancioli, A.; Duldner, J. E.; Topol, E. J.; Broderick, J. P. Decreased perihematoma edema in thrombolysis-related intracerebral hemorrhage compared with spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke*. 2000 Mar;31(3):596-600.
62. Gerecht-Nir, S.; Itskovitz-Eldor, J. The promise of human embryonic stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2004 Dec;18(6):843-852.
63. Gerecht-Nir, S.; Ziskind, A.; Cohen, S.; Itskovitz-Eldor, J. Human embryonic stem cells as an in vitro model for human vascular development and the induction of vascular differentiation. *Lab Invest*. 2003 Dec;83(12):1811-1820.
64. Giroud, M.; Gras, P.; Chadan, N.; Beuriat, P.; Milan, C.; Arveux, P.; Dumas, R. Cerebral haemorrhage in a French prospective population study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1991 Jul;54(7):595-598.
65. Gleeson, J. G.; Minnerath, S. R.; Fox, J. W.; Allen, K. M.; Luo, R. F.; Hong, S. E.; Berg, M. J.; Kuzniecky, R.; Reitnauer, P. J.; Borgatti, R.; Mira, A. P.; Guerrini, R.; Holmes, G. L.; Rooney, C. M.; Berkovic, S.; Scheffer, I.; Cooper, E. C.; Ricci, S.; Cusmai, R.; Crawford, T. O.; Leroy, R.; Andermann, E.; Wheless, J. W.; Dobyns, W. B.; Walsh, C. A.; . Characterization of mutations in the gene doublecortin in patients with double cortex syndrome. *Ann Neurol*. 1999 Feb;45(2):146-153.
66. Gleeson, J. G.; Walsh, C. A. Neuronal migration disorders: from genetic diseases to developmental mechanisms. *Trends Neurosci*. 2000 Aug;23(8):352-359.
67. Gould, E.; Tanapat, P. Lesion-induced proliferation of neuronal progenitors in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience*. 1997 Sep;80(2):427-436.

68. Green, H.; Easley, K.; Iuchi, S. Marker succession during the development of keratinocytes from cultured human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Dec;100(26):15625-15630.
69. Guo, L.; Kawazoe, N.; Fan, Y.; Ito, Y.; Tanaka, J.; Tateishi, T.; Zhang, X.; Chen, G. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on photoreactive polymer-modified surfaces. *Biomaterials*. 2008 Jan;29(1):23-32.
70. Hagg, T. Molecular regulation of adult CNS neurogenesis: an integrated view. *Trends Neurosci*. 2005 Nov;28(11):589-595.
71. Hart, R. G.; Tonarelli, S. B.; Pearce, L. A. Avoiding central nervous system bleeding during antithrombotic therapy: recent data and ideas. *Stroke*. 2005 Jul;36(7):1588-1593.
72. Hastings, N.; Gould, E. Erratum: rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells. *J comp neurol* 413:146-154. *J Comp Neurol*. 1999 Dec;415(1):144.
73. He, J. Q.; Ma, Y.; Lee, Y.; Thomson, J. A.; Kamp, T. J. Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: action potential characterization. *Circ Res*. 2003 Jul;93(1):32-39.
74. HEBB, C. O.; KONZETT, H. The effect of certain analgesic drugs on synaptic transmission as observed in the perfused superior cervical ganglion of the cat. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci*. 1949 Nov;35(3):213-217.
75. Heins, N.; Malatesta, P.; Cecconi, F.; Nakafuku, M.; Tucker, K. L.; Hack, M. A.; Chapouton, P.; Barde, Y. A.; Gotz, M. Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6. *Nat Neurosci*. 2002 Apr;5(4):308-315.
76. Helgason, C. M.; Wolf, P. A. American Heart Association Prevention Conference IV: prevention and rehabilitation of stroke: executive summary. *Circulation*. 1997 Jul;96(2):701-707.
77. Juvela, S.; Hillbom, M.; Palomaki, H. Risk factors for spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke*. 1995 Sep;26(9):1558-1564.
78. Kennea, N. L.; Mehmet, H. Neural stem cells. *J Pathol*. 2002 Jul;197(4):536-550.
79. Kern, S.; Eichler, H.; Stoeve, J.; Kluter, H.; Bieback, K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. 2006 May;24(5):1294-1301.
80. Kornack, D. R.; Rakic, P. The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Apr;98(8):4752-4757.
81. Kosodo, Y.; Roper, K.; Haubensak, W.; Marzesco, A. M.; Corbeil, D.; Huttner, W. B. Asymmetric distribution of the apical plasma membrane during neurogenic divisions of mammalian neuroepithelial cells. *EMBO J*. 2004 Jun;23(11):2314-2324.

82. Krampera, M.; Pizzolo, G.; Aprili, G.; Franchini, M. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. *Bone*. 2006 Oct;39(4):678-683.
83. Krupinski, J.; Kaluza, J.; Kumar, P.; Kumar, S.; Wang, J. M. Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke. *Stroke*. 1994 Sep;25(9):1794-1798.
84. Kuhn, H. G.; Dickinson-Anson, H.; Gage, F. H. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci*. 1996 Mar;16(6):2027-2033.
85. Lakshmipathy, U.; Verfaillie, C. Stem cell plasticity. *Blood Rev*. 2005 Jan;19(1):29-38.
86. Li, J. H.; Zhang, N.; Wang, J. A. Improved anti-apoptotic and anti-remodeling potency of bone marrow mesenchymal stem cells by anoxic pre-conditioning in diabetic cardiomyopathy. *J Endocrinol Invest*. 2008 Feb;31(2):103-110.
87. Li, Y.; Chen, J.; Wang, L.; Lu, M.; Chopp, M. Treatment of stroke in rat with intracarotid administration of marrow stromal cells. *Neurology*. 2001 Jun;56(12):1666-1672.
88. Lim, D. A.; Tramontin, A. D.; Trevejo, J. M.; Herrera, D. G.; Garcia-Verdugo, J. M.; Alvarez-Buylla, A. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron*. 2000 Dec;28(3):713-726.
89. Lledo, P. M.; Alonso, M.; Grubb, M. S. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci*. 2006 Mar;7(3):179-193.
90. Lois, C.; Alvarez-Buylla, A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*. 1994 May;264(5162):1145-1148.
91. Lois, C.; Garcia-Verdugo, J. M.; Alvarez-Buylla, A. Chain migration of neuronal precursors. *Science*. 1996 Feb;271(5251):978-981.
92. Luskin, M. B. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron*. 1993 Jul;11(1):173-189.
93. Ma, D. K.; Ming, G. L.; Song, H. Glial influences on neural stem cell development: cellular niches for adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol*. 2005 Oct;15(5):514-520.
94. Malatesta, P.; Hartfuss, E.; Gotz, M. Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development*. 2000 Dec;127(24):5253-5263.
95. Matarredona, E. R.; Murillo-Carretero, M.; Moreno-Lopez, B.; Estrada, C. Role of nitric oxide in subventricular zone neurogenesis. *Brain Res Brain Res Rev*. 2005 Sep;49(2):355-366.
96. Matsui, Y.; Zsebo, K.; Hogan, B. L. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell*. 1992 Sep;70(5):841-847.
97. Mattson, M. P.; Maudsley, S.; Martin, B. A neural signaling triumvirate that influences ageing and age-related disease: insulin/IGF-1, BDNF and serotonin. *Ageing Res Rev*. 2004 Nov;3(4):445-464.

98. Mayer, S. A.; Brun, N. C.; Begtrup, K.; Broderick, J.; Davis, S.; Diringer, M. N.; Skolnick, B. E.; Steiner, T. Recombinant activated factor VII for acute intracerebral hemorrhage. *N Engl J Med.* 2005 Feb;352(8):777-785.
99. Mayer, S. A.; Brun, N. C.; Begtrup, K.; Broderick, J.; Davis, S.; Diringer, M. N.; Skolnick, B. E.; Steiner, T. Efficacy and safety of recombinant activated factor VII for acute intracerebral hemorrhage. *N Engl J Med.* 2008 May;358(20):2127-2137.
100. Mayer, S. A.; Davis, S. M.; Skolnick, B. E.; Brun, N. C.; Begtrup, K.; Broderick, J. P.; Diringer, M. N.; Steiner, T. Can a subset of intracerebral hemorrhage patients benefit from hemostatic therapy with recombinant activated factor VII? *Stroke.* 2009 Mar;40(3):833-840.
101. Mendelow, A. D.; Gregson, B. A.; Fernandes, H. M.; Murray, G. D.; Teasdale, G. M.; Hope, D. T.; Karimi, A.; Shaw, M. D.; Barer, D. H. Early surgery versus initial conservative treatment in patients with spontaneous supratentorial intracerebral haematomas in the International Surgical Trial in Intracerebral Haemorrhage (STICH): a randomised trial. *Lancet.* 2005 Jan;365(9457):387-397.
102. Merkle, F. T.; Tramontin, A. D.; Garcia-Verdugo, J. M.; Alvarez-Buylla, A. Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Dec;101(50):17528-17532.
103. Mezey, E.; Key, S.; Vogelsang, G.; Szalayova, I.; Lange, G. D.; Crain, B. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Feb;100(3):1364-1369.
104. Ming, G. L.; Song, H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 2005;28:223-250.
105. Mirzadeh, Z.; Merkle, F. T.; Soriano-Navarro, M.; Garcia-Verdugo, J. M.; Alvarez-Buylla, A. Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell.* 2008 Sep;3(3):265-278.
106. Montaner, J.; Alvarez-Sabin, J.; Molina, C.; Angles, A.; Abilleira, S.; Arenillas, J.; Gonzalez, M. A.; Monasterio, J. Matrix metalloproteinase expression after human cardioembolic stroke: temporal profile and relation to neurological impairment. *Stroke.* 2001 Aug;32(8):1759-1766.
107. Munoz, R.; Gallego, J.; Herrera, M. [New perspectives on intracerebral haemorrhage]. *An Sist Sanit Navar.* 2008;31 Suppl 1:47-59.
108. Nimmerjahn, A.; Kirchhoff, F.; Helmchen, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science.* 2005 May;308(5726):1314-1318.
109. Nonaka, M.; Yoshikawa, M.; Nishimura, F.; Yokota, H.; Kimura, H.; Hirabayashi, H.; Nakase, H.; Ishizaka, S.; Wanaka, A.; Sakaki, T. Intraventricular transplantation of embryonic stem cell-derived neural stem cells in intracerebral hemorrhage rats. *Neurol Res.* 2004 Apr;26(3):265-272.



110. Norrving, B. The implementation of the helsingborg declaration on stroke management. *Ital J Neurol Sci.* 1998 Oct;19 Suppl 1:S32-S34.
111. Novikova, L. N.; Mosahebi, A.; Wiberg, M.; Terenghi, G.; Kellerth, J. O.; Novikov, L. N. Alginate hydrogel and matrigel as potential cell carriers for neurotransplantation. *J Biomed Mater Res A.* 2006 May;77(2):242-252.
112. Odorico, J. S.; Kaufman, D. S.; Thomson, J. A. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells.* 2001;19(3):193-204.
113. Ortega-Perez, I.; Murray, K.; Lledo, P. M. The how and why of adult neurogenesis. *J Mol Histol.* 2007 Dec;38(6):555-562.
114. Oswald, J.; Boxberger, S.; Jorgensen, B.; Feldmann, S.; Ehninger, G.; Bornhauser, M.; Werner, C. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells.* 2004;22(3):377-384.
115. Otero, L.; Bonilla, C.; Aguayo, C.; Zurita, M.; Vaquero, J. Intralesional administration of allogeneic bone marrow stromal cells reduces functional deficits after intracerebral hemorrhage. *Histol Histopathol.* 2010 Apra;25(4):453-461.
116. Otero, L.; Zurita, M.; Aguayo, C.; Bonilla, C.; Rodriguez, A.; Vaquero, J. Video-Tracking-Box linked to Smart software as a tool for evaluation of locomotor activity and orientation in brain-injured rats. *J Neurosci Methods.* 2010 Aprb;188(1):53-57.
117. Otero, L.; Zurita, M.; Bonilla, C.; Aguayo, C.; Vela, A.; Rico, M. A.; Vaquero, J. Late transplantation of allogeneic bone marrow stromal cells improves neurologic deficits subsequent to intracerebral hemorrhage. *Cytotherapy.* 2011 May;13(5):562-571.
118. Palmer, T. D.; Markakis, E. A.; Willhoite, A. R.; Safar, F.; Gage, F. H. Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J Neurosci.* 1999 Oct;19(19):8487-8497.
119. Palmer, T. D.; Ray, J.; Gage, F. H. FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain. *Mol Cell Neurosci.* 1995 Oct;6(5):474-486.
120. Pan, Y.; Chen, X.; Wang, S.; Yang, S.; Bai, X.; Chi, X.; Li, K.; Liu, B.; Li, L. In vitro neuronal differentiation of cultured human embryonic germ cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Feb;327(2):548-556.
121. Pekny, M.; Nilsson, M. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia.* 2005 Jun;50(4):427-434.
122. Pencea, V.; Bingaman, K. D.; Wiegand, S. J.; Luskin, M. B. Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J Neurosci.* 2001 Sep;21(17):6706-6717.
123. Peretto, P.; Merighi, A.; Fasolo, A.; Bonfanti, L. Glial tubes in the rostral migratory stream of the adult rat. *Brain Res Bull.* 1997;42(1):9-21.

124. Pittenger, M. F.; Mackay, A. M.; Beck, S. C.; Jaiswal, R. K.; Douglas, R.; Mosca, J. D.; Moorman, M. A.; Simonetti, D. W.; Craig, S.; Marshak, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999 Apr;284(5411):143-147.
125. Poulson, R.; Alison, M. R.; Forbes, S. J.; Wright, N. A. Adult stem cell plasticity. *J Pathol*. 2002 Jul;197(4):441-456.
126. Qu, H.; Guo, Y. H.; Zhu, X. J.; Gao, W.; Mao, J. M. [Anti-apoptotic effects of mesenchymal stem cells on cardiac myocytes: in vitro study with rats]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2007 Jan;87(4):271-274.
127. Qureshi, A. I.; Tuhim, S.; Broderick, J. P.; Batjer, H. H.; Hondo, H.; Hanley, D. F. Spontaneous intracerebral hemorrhage. *N Engl J Med*. 2001 May;344(19):1450-1460.
128. Rambhatla, L.; Chiu, C. P.; Kundu, P.; Peng, Y.; Carpenter, M. K. Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells. *Cell Transplant*. 2003;12(1):1-11.
129. Rao, M. S.; Mattson, M. P. Stem cells and aging: expanding the possibilities. *Mech Ageing Dev*. 2001 May;122(7):713-734.
130. Rao, M. S.; Shetty, A. K. Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus. *Eur J Neurosci*. 2004 Jan;19(2):234-246.
131. Rasmusson, I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res*. 2006 Jul;312(12):2169-2179.
132. Rincon, F.; Mayer, S. A. Novel therapies for intracerebral hemorrhage. *Curr Opin Crit Care*. 2004 Apr;10(2):94-100.
133. Robin, A. M.; Zhang, Z. G.; Wang, L.; Zhang, R. L.; Katakowski, M.; Zhang, L.; Wang, Y.; Zhang, C.; Chopp, M. Stromal cell-derived factor 1alpha mediates neural progenitor cell motility after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006 Jan;26(1):125-134.
134. Romagnani, P.; Lasagni, L.; Annunziato, F.; Serio, M.; Romagnani, S. CXC chemokines: the regulatory link between inflammation and angiogenesis. *Trends Immunol*. 2004 Apr;25(4):201-209.
135. Rosand, J.; Eckman, M. H.; Knudsen, K. A.; Singer, D. E.; Greenberg, S. M. The effect of warfarin and intensity of anticoagulation on outcome of intracerebral hemorrhage. *Arch Intern Med*. 2004 Apr;164(8):880-884.
136. Rosenberg, G. A.; Navratil, M. Metalloproteinase inhibition blocks edema in intracerebral hemorrhage in the rat. *Neurology*. 1997 Apr;48(4):921-926.
137. Sabatini, F.; Petecchia, L.; Tavian, M.; Jodon, de V., V.; Rossi, G. A.; Brouty-Boye, D. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. *Lab Invest*. 2005 Aug;85(8):962-971.

138. Sacco, R. L.; Shi, T.; Zamanillo, M. C.; Kargman, D. E. Predictors of mortality and recurrence after hospitalized cerebral infarction in an urban community: the Northern Manhattan Stroke Study. *Neurology*. 1994 Apr;44(4):626-634.
139. Sanchez-Ramos, J.; Song, S.; Cardozo-Pelaez, F.; Hazzi, C.; Stedeford, T.; Willing, A.; Freeman, T. B.; Saporta, S.; Janssen, W.; Patel, N.; Cooper, D. R.; Sanberg, P. R. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol*. 2000 Aug;164(2):247-256.
140. Schmechel, D. E.; Rakic, P. A Golgi study of radial glial cells in developing monkey telencephalon: morphogenesis and transformation into astrocytes. *Anat Embryol (Berl)*. 1979 Jun;156(2):115-152.
141. Segev, H.; Fishman, B.; Ziskind, A.; Shulman, M.; Itskovitz-Eldor, J. Differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing clusters. *Stem Cells*. 2004;22(3):265-274.
142. Shen, Q.; Goderie, S. K.; Jin, L.; Karanth, N.; Sun, Y.; Abramova, N.; Vincent, P.; Pumiglia, K.; Temple, S. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science*. 2004 May;304(5675):1338-1340.
143. Shi, S.; Bartold, P. M.; Miura, M.; Seo, B. M.; Robey, P. G.; Gronthos, S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res*. 2005 Aug;8(3):191-199.
144. Siesjo, B. K. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. *J Neurosurg*. 1992 Aug;77(2):169-184.
145. Smith, C. M.; Luskin, M. B. Cell cycle length of olfactory bulb neuronal progenitors in the rostral migratory stream. *Dev Dyn*. 1998 Oct;213(2):220-227.
146. Sottile, V.; Thomson, A.; McWhir, J. In vitro osteogenic differentiation of human ES cells. *Cloning Stem Cells*. 2003;5(2):149-155.
147. Stocum, D. L. Stem cells in regenerative biology and medicine. *Wound Repair Regen*. 2001 Nov;9(6):429-442.
148. Stout, R. D.; Suttles, J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol*. 2004 Sep;76(3):509-513.
149. Sulter, G.; Elting, J. W.; Langedijk, M.; Maurits, N. M.; De, Keyser J. Admitting acute ischemic stroke patients to a stroke care monitoring unit versus a conventional stroke unit: a randomized pilot study. *Stroke*. 2003 Jan;34(1):101-104.
150. Tang, T.; Hu, J. G.; Yang, J. F.; Zhou, X. M.; Yang, Y. F.; Yin, B. L.; Yu, B. T. [Effect of mesenchymal stem cells transplantation on the apoptosis after rat myocardial infarction]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2004 Jun;29(3):274-278.
151. Thomas, L. B.; Gates, M. A.; Steindler, D. A. Young neurons from the adult subependymal zone proliferate and migrate along an astrocyte, extracellular matrix-rich pathway. *Glia*. 1996 May;17(1):1-14.

152. Thomson, J. A.; Itskovitz-Eldor, J.; Shapiro, S. S.; Waknitz, M. A.; Swiergiel, J. J.; Marshall, V. S.; Jones, J. M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998 Nov;282(5391):1145-1147.
153. Torroglosa, A.; Murillo-Carretero, M.; Romero-Grimaldi, C.; Matarredona, E. R.; Campos-Caro, A.; Estrada, C. Nitric oxide decreases subventricular zone stem cell proliferation by inhibition of epidermal growth factor receptor and phosphoinositide-3-kinase/Akt pathway. *Stem Cells*. 2007 Jan;25(1):88-97.
154. Tropepe, V.; Coles, B. L.; Chiasson, B. J.; Horsford, D. J.; Elia, A. J.; McInnes, R. R.; van der Kooy, D. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science*. 2000 Mar;287(5460):2032-2036.
155. van, Praag H.; Schinder, A. F.; Christie, B. R.; Toni, N.; Palmer, T. D.; Gage, F. H. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*. 2002 Feb;415(6875):1030-1034.
156. Vaquero, J.; Zurita, M. Bone marrow stromal cells for spinal cord repair: a challenge for contemporary neurobiology. *Histol Histopathol*. 2009 Jan;24(1):107-116.
157. Vaquero, J.; Zurita, M. Functional recovery after severe CNS trauma: current perspectives for cell therapy with bone marrow stromal cells. *Prog Neurobiol*. 2011 Mar;93(3):341-349.
158. Vaquero, J.; Zurita, M.; Oya, S.; Santos, M. Cell therapy using bone marrow stromal cells in chronic paraplegic rats: systemic or local administration? *Neurosci Lett*. 2006 May;398(1-2):129-134.
159. Vats, A.; Tolley, N. S.; Polak, J. M.; Buttery, L. D. Stem cells: sources and applications. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 2002 Aug;27(4):227-232.
160. Vazquez, Mata G.; Rivera, Fernandez R.; Perez, Aragon A.; Gonzalez, Carmona A.; Fernandez, Mondejar E.; Navarrete, Navarro P. Analysis of quality of life in polytraumatized patients two years after discharge from an intensive care unit. *J Trauma*. 1996 Aug;41(2):326-332.
161. Wagner, W.; Wein, F.; Seckinger, A.; Frankhauser, M.; Wirkner, U.; Krause, U.; Blake, J.; Schwager, C.; Eckstein, V.; Ansorge, W.; Ho, A. D. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol*. 2005 Nov;33(11):1402-1416.
162. Wakai, S.; Yamakawa, K.; Manaka, S.; Takakura, K. Spontaneous intracranial hemorrhage caused by brain tumor: its incidence and clinical significance. *Neurosurgery*. 1982 Apr;10(4):437-444.
163. Wang, X.; Feuerstein, G. Z. Induced expression of adhesion molecules following focal brain ischemia. *J Neurotrauma*. 1995 Oct;12(5):825-832.
164. Weissman, I. L.; Anderson, D. J.; Gage, F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001;17:387-403.

165. Wexler, S. A.; Donaldson, C.; Denning-Kendall, P.; Rice, C.; Bradley, B.; Hows, J. M. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol.* 2003 Apr;121(2):368-374.
166. Woodbury, D.; Schwarz, E. J.; Prockop, D. J.; Black, I. B. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res.* 2000 Aug;61(4):364-370.
167. Xu, G.; Zhang, Y.; Zhang, L.; Ren, G.; Shi, Y. The role of IL-6 in inhibition of lymphocyte apoptosis by mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Sep;361(3):745-750.
168. Zhang, H.; Huang, Z.; Xu, Y.; Zhang, S. Differentiation and neurological benefit of the mesenchymal stem cells transplanted into the rat brain following intracerebral hemorrhage. *Neurol Res.* 2006 Jan;28(1):104-112.
169. Zhang, R. L.; Zhang, Z. G.; Zhang, L.; Chopp, M. Proliferation and differentiation of progenitor cells in the cortex and the subventricular zone in the adult rat after focal cerebral ischemia. *Neuroscience.* 2001;105(1):33-41.
170. Zhang, Z.; Jiang, Q.; Jiang, F.; Ding, G.; Zhang, R.; Wang, L.; Zhang, L.; Robin, A. M.; Katakowski, M.; Chopp, M. In vivo magnetic resonance imaging tracks adult neural progenitor cell targeting of brain tumor. *Neuroimage.* 2004 Sep;23(1):281-287.
171. Zurita, M.; Bonilla, C.; Otero, L.; Aguayo, C.; Vaquero, J. Neural transdifferentiation of bone marrow stromal cells obtained by chemical agents is a short-time reversible phenomenon. *Neurosci Res.* 2008 Mar;60(3):275-280.
172. Zurita, M.; Otero, L.; Aguayo, C.; Bonilla, C.; Ferreira, E.; Parajon, A.; Vaquero, J. Cell therapy for spinal cord repair: optimization of biologic scaffolds for survival and neural differentiation of human bone marrow stromal cells. *Cytotherapy.* 2010 Jul;12(4):522-537.
173. Zurita, M.; Vaquero, J. Functional recovery in chronic paraplegia after bone marrow stromal cells transplantation. *Neuroreport.* 2004 May;15(7):1105-1108.
174. Zurita, M.; Vaquero, J. Bone marrow stromal cells can achieve cure of chronic paraplegic rats: functional and morphological outcome one year after transplantation. *Neurosci Lett.* 2006 Jul;402(1-2):51-56.
175. Zurita, M.; Vaquero, J.; Bonilla, C.; Santos, M.; De, Haro J.; Oya, S.; Aguayo, C. Functional recovery of chronic paraplegic pigs after autologous transplantation of bone marrow stromal cells. *Transplantation.* 2008 Sep;86(6):845-853.
176. Zurita, M.; Vaquero, J.; Oya, S.; Bonilla, C.; Aguayo, C. Neurotrophic Schwann-cell factors induce neural differentiation of bone marrow stromal cells. *Neuroreport.* 2007 Oct;18(16):1713-1717.
177. Zurita, M.; Vaquero, J.; Oya, S.; Montilla, J. Functional recovery in chronic paraplegic rats after co-grafts of fetal brain and adult peripheral nerve tissue. *Surg Neurol.* 2001 May;55(5):249-254.

